



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS**

TRABAJO FINAL
Licenciatura en Química y Tecnología Ambiental

**“Estudio de residuos de compuestos farmacéuticos de uso humano en
músculo de peces de interés comercial del Río Uruguay”**

Macarena Gisele Rojo

(Febrero de 2016)

Director:

Dr. Pedro Carriquiriborde¹.

Profesor Adjunto Universidad Nacional de La Plata,
Investigador Independiente CONICET

Tutor:

Lic. Diego Cristos²

Investigador -Profesional de Gestión Externa INTA,
Auxiliar Docente Universidad Nacional del Oeste

Lugar de trabajo:

¹Centro de Investigaciones del Medio Ambiente (CIMA),

Facultad de Ciencias Exactas,

Universidad Nacional de La Plata.

Calle 47 y 115, 1900 La Plata, Bs. As., Argentina

Tel/Fax: =54 221 4229329

²Laboratorio de Contaminantes Químicos,

Área de Protección de alimentos,

Instituto Tecnología de Alimentos (ITA),

Centro de Investigación de Agroindustria (CIA),

Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA)

Complejo INTA Castelar (actividades experimentales).

Nicolás Repetto y de los Reseros s/n (1686),

Hurlingham Provincia de Buenos Aires

Tel: +54 11 46210446

Financiamiento:

Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT),
PICT2014-1690. Dr. Pedro Carriquiriborde.

Comisión Administradora del Río Uruguay (CARU). Beca de Estudiante de
Grado CARU.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quiero agradecer a la Comisión Administradora del Río Uruguay (CARU) por brindarme la infraestructura necesaria para la recolección de las muestras del presente trabajo.

Al Dr. Pedro Carriquiriborde, quien me enseñó, guió y acompañó en el desarrollo de este trabajo.

Al Lic. Diego Cristos por facilitarme el uso del equipo HPLC-MS/MS del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), sin el cual no hubiera podido llevar adelante el presente trabajo.

Al Dr. Damián Marino y al Dr. Alberto Capparelli, por la buena predisposición para ser jurados del presente trabajo final.

A mi mamá y mi papá (Blanca y Luis) porque siempre me apoyaron, acompañaron y nunca dejaron que baje los brazos, sin ellos yo no podría haber llegado hasta acá. ¡¡Les voy a estar eternamente agradecida, los amo!!

A mi tío German y a mi abuela Feliza que siempre estuvieron presentes en cada momento para cualquier cosa que yo necesitara, ya sea un abrazo o una palabra de aliento. ¡¡Gracias a ambos por siempre impulsarme a seguir adelante y compartir cada momento importante en mi vida!!

A mi amor Franco, quien me escuchó, aconsejó y apoyó en todo momento a lo largo de la carrera ¡¡Gracias por festejar conmigo cada logro y por la compañía en cada desilusión!!

A mis amigos de la vida y a todos mis allegados que siempre me desearon lo mejor ¡¡Gracias por todos los buenos deseos y la buena onda!!

A todos mis amigos, los que conocí en los primeros años de la facultad y a los Hippies, mis amigos con los que fui compartiendo estos últimos años de carrera. ¡¡A todos gracias por cada momento vivido, sin ustedes la facultad no hubiese sido lo mismo!!

Por ultimo quiero agradecer a todos mis compañeros del CIMA, que siempre me trataron como una más, estuvieron dispuestos a ayudarme y a escucharme. ¡¡Gracias a todos!!

¡¡Mil gracias a cada uno por cada granito de arena aportado en la finalización de esta etapa!!

ÍNDICE

1. RESUMEN	6
2. INTRODUCCIÓN	7
2.1. Contaminantes Emergentes y su relevancia ambiental	7
2.2. Los compuestos farmacéuticos como contaminantes emergentes	7
2.3. El Río Uruguay y sus recursos pesqueros	8
2.4. La problemática de los compuestos farmacéuticos en el Río Uruguay	10
2.5. Análisis de residuos de compuestos farmacéuticos en tejido de peces.	11
2.6. Antecedentes sobre niveles de fármacos en tejido de peces	12
3. HIPOTESIS Y OBJETIVOS	14
3.1. Hipótesis	14
3.2. Objetivo General	14
3.3. Objetivos Específicos	14
4. MATERIALES Y MÉTODOS	15
4.1. Criterio de Selección y obtención de los compuestos farmacéuticos estudiados	15
4.2. Criterio de selección de las especies y obtención de las muestras de músculo de peces	15
4.3. Adaptación de la metodología analítica	18
4.3.1. Fundamento y desarrollo del método instrumental	18
4.3.2. Extracción de los fármacos de las muestras de músculo	22
4.4. Determinación de los compuestos farmacéuticos seleccionados en tejido de peces.	26
4.5. Obtención y análisis de datos	26
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	28
5.1. Método instrumental para el análisis de los fármacos estudiados por HPLC-MS/MS	28
5.2. Eficiencia de las mezclas de extracción	31
5.3. Efecto matriz, reproducibilidad y sensibilidad del método	33

5.4. Determinación de atenolol, carbamazepina, cafeína, sildenafil, enalapril y metformina en muestras ambientales	36
6. CONCLUSIONES	40
7. BIBLIOGRAFIA	41
8. ANEXOS	43
8.1. Anexo I. Valores de áreas cromatográficas obtenidas para los estándares	44
8.2. Anexo II. Curvas de calibración de los compuestos farmacéuticos estudiados en metanol.	45
8.3. Anexo III. Valores de áreas análisis de recuperación.	46
8.4. Anexo IV. Valores de áreas cromatográficas obtenidas para los análisis de efecto matriz	47
8.5. Anexo V. Curvas realizadas por fortificación de los extractos	48

1. RESUMEN

Los antiinflamatorios, antihipertensivos, anticonvulsivos y estimulantes son los fármacos comúnmente más utilizados por la población. Luego del consumo, una fracción de los productos farmacéuticos se excreta en forma original o como metabolitos en la orina o las heces. Las plantas de tratamiento de efluentes cloacales, cuando existen, suelen ser ineficientes en la remoción de gran parte de estos compuestos, permitiendo de esta forma el ingreso de los mismos a los cuerpos de agua superficiales, pudiendo afectar a los organismos no blanco como los peces. En Argentina, existe evidencia sobre la presencia de fármacos humanos en los cuerpos de agua receptores de efluentes cloacales (concentraciones en el rango de ng/L o µg/L). Además, existen evidencias a nivel internacional de que estos contaminantes pseudopersistentes se acumulan en los tejidos de los peces.

En base a los antecedentes, el objetivo de este estudio se basó en adaptar una metodología analítica, acorde a la medida de las posibilidades, para estudiar los niveles de concentración de atenolol, cafeína, carbamazepina, enalapril, metformina, paracetamol (acetaminofén) y sildenafil en el músculo de las especies sábalo (*Prochilodus lineatus*), dorado (*Salminus brasiliensis*), boga (*Leporinus obtusidens*) y bagre amarillo (*Pimelodus maculatus*) recolectadas en el Río Uruguay (Villa Paranacito), por cromatografía líquida de alta eficiencia acoplada a espectrometría de masas en tándem (HPLC-MS/MS).

Para ello, como instancia principal fue necesario el desarrollo del método instrumental para determinar los compuestos por HPLC-ESI (+)-MS/MS y la optimización de la metodología de extracción para la determinación de las concentraciones de los fármacos seleccionados, para la cual se estudiaron las mezclas de extracción: ácido acético-metanol, acetonitrilo-metanol, acetato de etilo-metanol, acetato de etilo-acetona y acetona-metanol. Como etapa final del trabajo se procedió en la determinación de los niveles de concentración de los fármacos humanos estudiados con la mezcla de extracción que resultó más eficiente.

La mezcla acetato de etilo-acetona arrojó los mejores resultados y a partir de ello, considerando todas las especies, se reportaron valores medios de concentración para atenolol, cafeína, carbamazepina, metformina y sildenafil de 191,6, 15,5, 56,0, 27,8 y 24,4 µg/Kg, respectivamente. Enalapril no fue detectado y paracetamol no pudo ser medido. La mayor cantidad de fármacos detectables en relación a las especies respetó el orden: bagre amarillo>sábalo> dorado> boga. Para metformina y sildenafil serían los primeros reportes de niveles cuantificables de estos fármacos a nivel internacional, resaltando la importancia de este estudio, que permitió detectar los primeros resultados de concentraciones de estos compuestos en músculos de peces de importancia pesquera y para el consumo en el Río Uruguay.

2. INTRODUCCIÓN

2.1. Contaminantes Emergentes y su relevancia ambiental

Un "contaminante emergente" es una sustancia química natural o sintética o microorganismo que no ha sido históricamente considerado en la legislación y/o planes de monitoreo ambiental pero que es capaz de ingresar al ambiente y representa una amenaza potencial o real para la salud humana o el medio ambiente. En algunos casos, su presencia en el ambiente puede haber ocurrido durante un largo tiempo, pero puede haber no sido reconocida hasta que se desarrollaron nuevos métodos de detección. En otros, puede tratarse de síntesis de nuevas sustancias o cambios de uso o disposición final de sustancias preexistentes que generan nuevas fuentes o vías de ingreso al ambiente y/o exposición para los seres humanos, o se ha desarrollado un nuevo método para su detección (EPA 2012). El estudio de este tipo de compuestos se encuentra entre las líneas de investigación prioritarias de los principales organismos dedicados a la protección de la salud pública y medioambiental, tales como la Organización Mundial de la Salud (OMS), la Agencia para la Protección del Medio Ambiente (EPA), o la Comisión Europea (CE).

En muchos casos se tiene escasa información acerca de la presencia e impacto de estos compuestos en diversos compartimentos ambientales, debido a escasa o nula disponibilidad de métodos para su análisis y en consecuencia no han sido aún regulados. Otra particularidad de estos compuestos, es que debido a su elevada producción, consumo y a la introducción continua de los mismos en el medio ambiente, pueden ocasionar efectos adversos en los organismo no blanco, sin la necesidad de ser persistentes (Petrovic et al., 2003).

2.2. Los compuestos farmacéuticos como contaminantes emergentes

Dentro de los contaminantes emergentes, los que probablemente han originado mayor preocupación y estudio en los últimos años son los fármacos. Los productos farmacéuticos, son sustancias químicas sintéticas o naturales que se pueden encontrar en medicamentos recetados o de venta libre y de uso veterinarios. Forman parte de los contaminantes emergentes y pueden alcanzar los cuerpos de agua superficial a través de aguas residuales que transportan excretas de personas que los hayan utilizado; ya sea por eliminación inapropiada de medicamentos o por medio de residuos líquidos agrícolas, incluido el estiércol del ganado (Boxall et al., 2012).

Luego del consumo, una fracción de los productos farmacéuticos se excreta en forma original o como metabolitos en la orina o las heces. Las plantas de tratamiento de líquidos cloacales, cuando existen, suelen ser ineficientes en la remoción de gran parte de los compuestos farmacéuticos. De esta forma, estos compuestos alcanzan

finalmente los cuerpos de agua superficiales. Aunque suelen excretarse en pequeñas cantidades, lo hacen de forma continua, lo cual a ha llevado a considerarlos como contaminantes pseudopersistentes. Las concentraciones de los mismos en los efluentes de las plantas depuradoras han sido identificados en las aguas superficiales e incluso también fueron detectados en el agua potable (Boxall et al., 2012).

Las primeras evidencias de la presencia de fármacos en el medio acuático se produjeron en los años 70 con la identificación en aguas residuales en USA del ácido clofibrato, que es el metabolito activo de varios reguladores de lípidos en sangre (clofibrato, etofilin clofibrato, y etofibrato). Sin embargo, no ha sido hasta principios de la década de los 90 que el tema de los fármacos en el medio ambiente ha surgido con fuerza, como demuestran los numerosos artículos publicados desde entonces, los cuales han despertado un gran interés científico y social (Boxall et al., 2012).

En Argentina uno de los primeros estudios realizados en efluentes cloacales de ciudades con distintos grados de urbanización han encontrado concentraciones por encima de 13 y 9 $\mu\text{g/L}$ para la cafeína e ibuprofeno y entre 0,7 y 0,5 $\mu\text{g/L}$ para el caso de carbamazepina, atenolol y diclofenac (Elorriaga et al., 2013a). Las concentraciones que se han encontrado en aguas superficiales (como consecuencia de una eliminación incompleta en las plantas de depuración de aguas) o en aguas subterráneas (debido a la escasa atenuación que experimentan algunos compuestos durante la filtración a través de suelos) se sitúan normalmente en el rango de ng/L o $\mu\text{g/L}$ (Elorriaga et al., 2013b).

En general se admite que las sustancias con coeficiente de partición octanol-agua ($\log K_{ow}$) superiores a o igual a 3, tienen el potencial para bioacumularse en tejidos biológicos. Sin embargo, al considerar la bioacumulación de productos farmacéuticos en los organismos acuáticos, hay que tener otros factores en consideración, como las diferentes tasas de metabolismo en diversos organismos, el comportamiento de acumulación de los metabolitos, la cinética de captación y depuración y el grado de ionización que depende del pH, entre otras cosas. En tal sentido cabe resaltar que son sustancias pH dependientes y que tienen una estrecha relación con transportadores para atravesar las membranas celulares (Zenker et al., 2014).

La falta de conocimiento sobre la biodegradación y biotransformación de productos farmacéuticos en organismos no-blanco es un tema crucial y necesita una mayor exploración (Huerta et al., 2012).

2.3.El Río Uruguay y sus recursos pesqueros

La cuenca del Río Uruguay se localiza en el sector noreste del país abarcando las provincias de Entre Ríos, Corrientes y Misiones. Se trata de una cuenca compartida con Uruguay y Brasil que forma parte de la Hoya Hidrográfica del Plata. Abarca

339.000 Km² de superficie, teniendo su río principal, el Uruguay, un 32% aproximadamente en territorio brasileiro, un 38% en el límite entre Argentina y Brasil y un 30% entre Argentina y Uruguay. Este cuerpo de agua de 1800 km de longitud, posee sus nacientes en el estado de Santa Catarina (Brasil), cerca de la localidad de Florianópolis en la Sierra Del Mar. Luego de atravesar gran parte del sur de Brasil pasa a ser límite de este país y Argentina (en las provincias de Misiones y Corrientes) corriendo en su tramo final como límite entre Argentina (Provincia de Entre Ríos) y la República Oriental del Uruguay (<http://www.hidricosargentina.gov.ar/>).

El terreno de la cuenca posee un relieve muy variado con numerosos valles y un sistema fluvial muy ramificado formado por cursos de agua de corto recorrido y de acentuada pendiente.

Desde el punto de vista ictiogeográfico, este río, donde habitan más de 150 especies de peces, se considera incluido en la Región Guayano-Brasílica y dentro de ella, en la provincia Parano-Platense, cuyo límite sur es el Río de la Plata. Existe una gran afinidad entre la ictiofauna del río Uruguay y la del sistema del Paraná, cuyos elementos predominantes pertenecen a los órdenes characiformes y siluriformes, que, por otra parte, son los que han experimentado la más importante radiación adaptativa en los sistemas fluviales de Sudamérica y ocupan actualmente los más diversos ambientes y nichos ecológicos.

Las características más sencillas que permiten reconocer los peces que pertenecen al orden characiformes son: presencia de escamas, aleta adiposa generalmente presente (se ubica en la región dorsal y posterior del cuerpo) y las aletas pélvicas, que se ubican detrás de las aletas pectorales (las aletas pectorales y pélvicas son aletas pares, ubicadas cerca de la región ventral). Entre ellos se encuentran especies carnívoras, fitófagas, iliófagas y omnívoras, con tamaños que van desde mojarras de pocos centímetros, hasta dorados de más de un metro de longitud. Este grupo está compuesto además, por los dientudos, las pirañas, las tarariras, las bogas y los sábalo.

Los siluriformes en general son peces bentónicos, con cuerpo alargado, carentes de escamas o recubiertos por placas, presentan tentáculos o barbillas que se extienden a cada lado de la mandíbula superior y en algunas especies, también de la mandíbula inferior. Las aletas dorsales y pectorales tienen espinas puntiagudas. Las viejas de agua constituyen el grupo más numeroso del orden, junto con los bagres y armados. Otros siluriformes importantes son el surubí y el patí, peces ictiófagos de gran importancia pesquera.

Las especies con comportamiento migratorio, como el dorado, la boga, el sábalo, el surubí o el patí, son en general las de tamaño más grande y de mayor interés pesquero ([CARU, 1998](#)).

El Río Uruguay constituye un importante recurso hídrico cuyo potencial de desarrollo está aún en una etapa incipiente. Las aguas de este río y sus afluentes son utilizadas con una diversidad de fines: consumo humano, navegación, generación de energía, industrias, irrigación y pesca entre las más importantes. El mantenimiento del mismo en condiciones tales que pueda servir a las generaciones actuales y futuras es un deber que han asumido las partes que comparten este tramo del río.

2.4. La problemática de los compuestos farmacéuticos en el Río Uruguay

Los antiinflamatorios, antihipertensivos, anticonvulsivos y estimulantes son los fármacos comúnmente más utilizados por la población, siendo entre ellos representativos el ibuprofeno, diclofenac, atenolol, carbamazepina y cafeína. Estudios recientes muestran que estos compuestos se encuentran en los cuerpos de agua superficiales de nuestro país ([Elorriaga et al., 2013b](#)). Esta presencia puede explicarse por el uso generalizado y su permanente descarga en los cuerpos de agua superficial que excede el tiempo de degradación de dichos fármacos. Se desconoce aún el potencial riesgo que ello representa para el funcionamiento de los ecosistemas.

Existen evidencias que estos contaminantes pseudopersistentes pueden acumularse en los tejidos de los peces ([Brooks et al., 2005](#); [Ramirez et al., 2009](#)). Debido a que los fármacos están diseñados particularmente para actuar en rutas metabólicas y moleculares específicas en humanos y animales, una de las principales preocupaciones en relación con su presencia en el ambiente, se debe a la alta probabilidad de que estos (en su forma original o en forma de metabolitos) sean biológicamente activos en los organismos acuáticos, pudiendo generar alteraciones no intencionales en especies no blanco ([Huerta et al., 2012](#)).

En particular, los peces poseen un papel importante en los ecosistemas acuáticos, conducen energía activamente a través de la cadena trófica, constituyen una forma de almacenamiento de energía dentro del ecosistema y son agentes de regulación energética. Debido a estas características y a su gran movilidad a través de los cuerpos de agua, son considerados los organismos más susceptibles a la bioacumulación de fármacos ([Corcoran et al., 2010](#)).

El Río Uruguay es receptor de los efluentes cloacales sin previo tratamiento de un gran número de ciudades de un tamaño poblacional considerable que se encuentran sobre sus orillas tanto de la margen argentina como uruguaya. De esta manera los compuestos farmacéuticos estarían ingresando al ambiente acuático y en consecuencia los peces podrían estar bioacumulando este tipo de contaminantes, lo que podría tener influencia no sólo sobre la salud de los peces sino también para la actividad pesquera, por el potencial colapso de las pesquerías y/o calidad del producto por la presencia de residuos de tales contaminantes, que es de gran importancia para Argentina y los

países limítrofes como Uruguay, con el que comparten una Zona Común de Pesca en este sitio ([Observatorio de Políticas Públicas, SAGPyA, www.sgp.gov.ar](#)).

La Comisión Administradora del Río Uruguay (CARU) desde su creación en 1978, realiza periódicamente trabajos de relevamiento de recursos ícticos con el propósito de evaluar y conservar la biota ([Peces del Río Uruguay, CARU, www.caru.org.uy](#)). Este organismo ha venido estudiando residuos de contaminantes tradicionales (PCBs, pesticidas organoclorados, metales) en especies de peces de interés comercial en la región, pero no dispone de información sobre concentraciones de contaminantes emergentes como los fármacos.

2.5. Análisis de residuos de compuestos farmacéuticos en tejido de peces.

La cromatografía líquida en tándem con detección espectrofotométrica, tales como la detección por red de diodos, detección de absorbancia UV y fluorescencia, son metodologías de análisis que han sido tradicionalmente utilizadas para la detección de algunos fármacos en organismos acuáticos. Sin embargo, en los últimos años la mayoría de los métodos de análisis para la identificación y determinación de fármacos en biota se basan en cromatografía líquida (LC) o cromatografía gaseosa en combinación con espectrometría de masas (MS). La cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas simple (LC- MS) o en tándem (LC -MS/MS) ha ganado gran popularidad en la última década debido a su compatibilidad con compuestos polares y no volátiles. En particular, la cromatografía líquida de ultra eficiencia (UPLC) ha ido creciendo sobre la de alta eficiencia (HPLC) dado que proporciona picos estrechos y mejora las separaciones cromatográficas, acortando el tiempo de análisis. Las interfaces más comunes que permiten acoplar la cromatografía líquida a la espectrometría de masas son la ionización por electrospray (ESI) y la ionización química a presión atmosférica (APCI). Sin embargo la ESI ha sido utilizada preferentemente debido a que solamente unos pocos fármacos pueden ser ionizados eficientemente por APCI. La espectrometría de masas MS/MS proporciona una elevada selectividad, especificidad y sensibilidad requerida para este tipo de estudios. En los últimos años, la espectrometría de masas simple en tándem (LC -MS/MS) se ha vuelto el método de detección por excelencia debido a su confiabilidad en la identificación de los fármacos a niveles de hasta partes por trillón ([Huerta et al., 2012](#)). En cuanto a los métodos de pretratamiento de muestras que se han utilizado para la extracción de fármacos de los músculos de los peces se encuentran: la extracción por ultrasonido (USO), la extracción asistida por microondas, la extracción por QuEChERS, la extracción líquida a presión (PLE) y el método del extractor rotatorio ([Ramírez et al., 2007](#)). La extracción ultrasónica adaptada por ([Schultz et al., 2010](#)), consiste en la utilización de una mezcla acuosa de ácido acético-metanol como solvente de extracción. La extracción incluye ciclos de ultrasonificación, el sobrenadante se recoge después de cada ciclo y se centrifuga. La segunda metodología es la de QuEChERS (de las siglas en inglés: rápido, sencillo, barato, efectivo, robusto y

seguro), que implican la extracción y purificación a micro- escala del extracto mediante extracción en fase sólida de dispersión (D-SPE). La extracción líquida presurizada (PLE) es un método desarrollado para la extracción de muestra sólidas o semisólidas que emplea solventes líquidos a temperaturas y presiones elevadas para preparar muestras para el análisis ya sea por cromatografía líquida o gaseosa. Es similar a una extracción Soxhlet, excepto que durante el proceso de extracción la condición de disolvente dentro de la célula PLE se aproxima a la región supercrítica que se traduce en extracciones más eficientes. La temperatura elevada permite que la muestra sea más soluble y en consecuencia logre una velocidad de difusión más alta mientras que la presión elevada mantiene el disolvente por debajo de su punto de ebullición. En elevadas presiones y temperaturas los disolventes pueden penetrar muestras sólidas de manera más eficiente reduciendo el uso de solventes (Carabias-Martínez et al., 2005). La ultrasonificación y la extracción líquida a presión (PLE), han sido las técnicas más utilizadas para la extracción de fármacos en organismos acuáticos, tales como: crustáceos, mejillones, algas y peces (Chu and Metcalfe, 2007a, b; Subedi et al., 2011; Huerta et al., 2013).

Dado que las muestras de tejido suelen contener una gran cantidad de proteínas, el procedimiento de extracción requiere una alta eficiencia. Aun así, en ciertos casos es necesaria una nueva etapa de purificación (“clean-up”) posterior del extracto. Entre los métodos más utilizados se encuentran la extracción líquido-líquido con hexano para eliminar los lípidos y la extracción en fase sólida (SPE) con cartuchos Oasis-HLB, alúmina o con florisil (Huerta et al., 2013).

En particular, el método del extractor rotatorio de Ramírez et al. (2007) consiste en la homogenización de la muestra empleando una mezcla de solventes de extracción, su posterior agitación en un extractor rotatorio y finalmente su centrifugación a alta velocidad. El sobrenadante es analizado luego por HPLC-MS. En su versión original, el método no incluye “clean-up”, lo que lo hace muy sencillo y ha demostrado recuperaciones mayores al 90% para la carbamazepina y el ibuprofeno.

2.6. Antecedentes sobre niveles de fármacos en tejido de peces

Uno de los primeros estudios que confirmaron la presencia de productos farmacéuticos en peces de agua dulce fueron publicadas por Brooks et al. (2005), que informó sobre concentraciones máximas de hasta 30 ng/g de fluoxetina sertralina y sus metabolitos en tejido cerebral de tres especies recolectadas en un arroyo receptor de efluentes cloacales situado en Texas (USA). Luego, Ramírez et al. (2007) extendieron este estudio para una lista más larga de los productos farmacéuticos, e informaron sobre la acumulación de difenhidramina, el diltiazem y la carbamazepina en los peces recogidos del mismo arroyo. Como resultado, un estudio piloto a nivel nacional fue llevado a cabo por la Oficina de Ciencia y Tecnología de la USEPA en conjunto con la empresa Tetra Tech y la Universidad de Baylor para el análisis de los peces de cinco ríos en varias partes de USA (Ramírez et al., 2009). Casi simultáneamente, un método de análisis desarrollado por Chu and Metcalfe (2007a) se aplicó con éxito para el análisis

de algunos medicamentos psiquiátricos en muestras de peces recogidos de puerto de Hamilton, que es una ensenada de urbanización e industrialización del lago Ontario (Canadá). Las concentraciones máximas de paroxetina, fluoxetina y norfluoxetina detectadas fueron alrededor de 1 ng/g de peso húmedo. Otro estudio reciente confirmó la presencia de 17 α -etinilestradiol, un estrógeno sintético prescrito como anticonceptivo, a una concentración de 1-2 ng/g en peces silvestres recogidos cerca de una planta de tratamiento de aguas residuales en el río del St. Clair, Canadá ([Al-Ansari et al., 2010](#)).

En Europa, la mayoría de los datos sobre la presencia de los productos farmacéuticos, principalmente antibióticos, en los organismos acuáticos han surgido de estudios de acuicultura y control de los alimentos, estrechamente relacionados con el consumo y la regulación de la demanda humana. En tales estudios fueron hallados hasta 87 ng/g de eritromicina y 152,2 ng/g de tetraciclinas en músculos de peces provenientes de España por [Berrada et al. \(2008\)](#) y [Cháfer-Pericás et al. \(2010\)](#), respectivamente, mientras que en otros estudios no se encontraron residuos farmacéuticos en los peces. En un estudio más reciente dirigido específicamente al estudio de los niveles de fármacos en peces silvestres, [Huerta et al. \(2013\)](#) detectaron una gran variedad de compuestos farmacéuticos (diclofenac, citalopran, carbamazepina, venlafaxina, clopidogrel, carazolol, propanolol, sotalol y salbutamol) en ríos de España que desaguan al Mediterráneo con concentraciones de carbamazepina de hasta 17,9 ng/g. Otro estudio realizado en Alemania analizó 15 compuestos, encontrando difenhidramina y n-desmetilsertralina (metabolito de la sertralina) a concentraciones de hasta 0,07 y 3,28 ng/g, respectivamente ([Subedi et al., 2012](#)).

Pese a la creciente evidencia a nivel internacional sobre la acumulación de los compuestos farmacéuticos en peces que viven en ambientes influenciados por descargas cloacales, no existen casi trabajos que informen sobre este aspecto para Latinoamérica o Argentina.

3. HIPOTESIS Y OBJETIVOS

Teniendo en cuenta los antecedentes enunciados a la introducción respecto a la frecuencia de uso y descarga, su comportamiento químico y la necesidad regional de generar información respecto a los niveles de concentración de fármacos en músculo de peces, se plantea la siguiente hipótesis y objetivos de estudio.

3.1. Hipótesis

Es factible adaptar metodologías analíticas acorde a las capacidades analíticas disponibles para la determinación de residuos de compuestos farmacéuticos en músculo de peces y su utilización para realizar las primeras determinaciones en especies de importancia pesquera a nivel de la Cuenca del Plata.

3.2. Objetivo General

Adaptar una metodología analítica acorde a la medida de las posibilidades para estudiar los niveles de concentración de compuestos farmacéuticos en músculo de peces por cromatografía líquida de alta eficiencia acoplada a espectrometría de masas en tándem (HPLC-MS/MS) y realizar una primera exploración en especies de relevancia pesquera a nivel regional.

3.3. Objetivos Específicos

1. Adaptar metodologías previamente desarrolladas por otros autores a las capacidades analíticas disponibles para el pre-tratamiento y análisis de compuestos farmacéuticos de relevancia regional en músculo de peces por cromatografía líquida de alta eficiencia acoplada a espectrometría de masas en tándem (HPLC-MS/MS).
2. Aplicar dichos métodos para estudiar por primera vez los valores de concentración de estos analitos en especies de peces de relevancia pesquera en la Cuenca del Plata (sábalo, dorado, boga, bagre amarillo, etc.) obtenidas de muestreos realizados en el Río Uruguay.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

En la presente sección se presentan los criterios, metodologías, equipos, materiales y reactivos utilizados para alcanzar los objetivos propuestos.

4.1. Criterio de Selección y obtención de los compuestos farmacéuticos estudiados

Los compuestos farmacéuticos utilizados en la presente tesina fueron definidos en base a: i) su poblada presencia en muestras de efluentes cloacales y/o aguas superficiales de nuestra región o su amplia prescripción en nuestra región, y ii) la posibilidad de ser analizados por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) acoplada a espectrometría de masas en tándem (MS/MS) mediante una fuente de ionización a presión atmosférica de tipo electro spray en modo positivo (ESI-Pos).

Por el tiempo disponible para el desarrollo de la tesina sólo se trabajó con compuestos que ionicen en el mismo modo, en este caso en modo positivo.

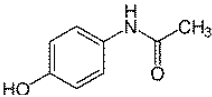
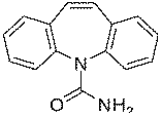
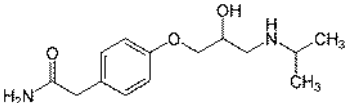
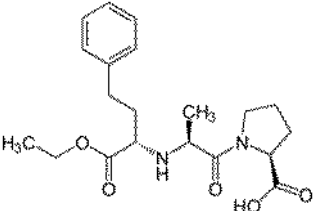
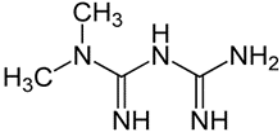
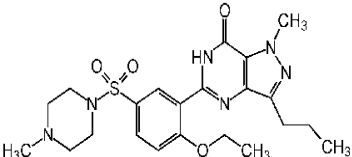
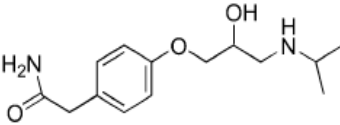
En función de lo antes mencionado, los compuestos farmacéuticos seleccionados han sido: atenolol, caféina, carbamazepina, enalapril, metformina, paracetamol (acetaminofén) y sildenafil. La estructura molecular y las principales propiedades fisicoquímicas se muestran en la [Tabla 3.1](#).

4.2. Criterio de selección de las especies y obtención de las muestras de músculo de peces

En función de la factibilidad de su captura, la relevancia pesquera y la importancia para el consumo, las especies seleccionadas fueron: sábalo (*Prochilodus lineatus*), dorado (*Salminus brasiliensis*), boga (*Leporinus obtusidens*) y bagre Amarillo (*Pimelodus maculatus*).

Las muestras de músculo para la puesta a punto de la metodología analítica y determinación de concentraciones de compuestos farmacéuticos fueron obtenidas de peces en el Río Uruguay a la altura de Villa Paranacito ([Figura 3.1](#)). Esta es una zona relativamente poco influenciada por descargas cloacales dado que no hay grandes ciudades sobre ese tramo del río.

Tabla 3.1. Principales propiedades de los fármacos seleccionados

<i>Acción terapéutica</i>	<i>Compuesto</i>	<i>Estructura</i>	<i>Log Kow</i>	<i>pKa</i>	<i>Peso Molecular (g/mol)</i>
Analgésico	Paracetamol		0,34	9,4	151,2
Anticonvulsivo	Carbamazepina		2,45	13,9	236,3
Antihipertensivo	Atenolol		0,10	pKa1:9,6 pKa2:14,0 pKa3:15,9	266,3
Antihipertensivo	Enalapril		2,45	pKa1:2,7 pKa2:5,3	376,4
Antidiabético	Metformina		-1,40	12,4	129,2
Disfunción eréctil	Sildenafil		2,75	pKa1:6,0 pKa2:10,9	474,6
Estimulante	Cafeína		-0,13	14,0	194,2

Fuente: Huerta et al., 2013; Ramírez et al., 2007; Ramírez et al., 2009; USEPA, 2015

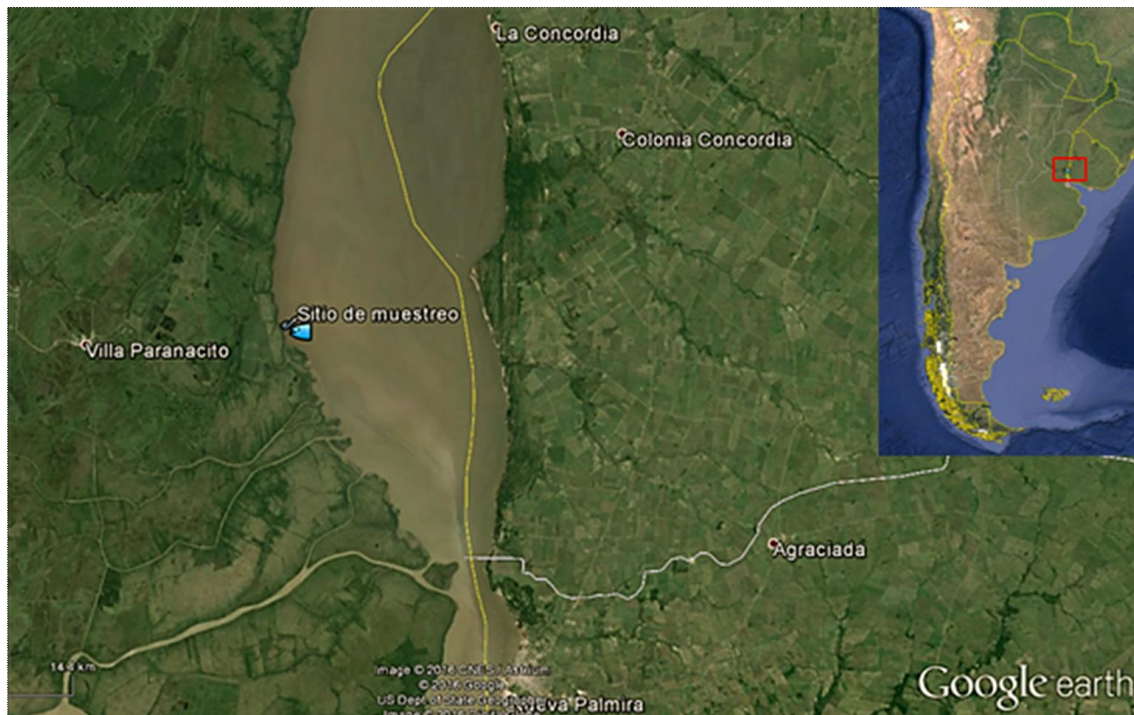


Fig. 3.1. Sitio de muestreo en el Bajo Uruguay próximo a la localidad de Villa Paranacito.

Los muestreos fueron realizados en el marco de las campañas realizadas en el “Programa de Relevamiento de Ictiofauna” de la Comisión Administradora del Río Uruguay. En tal programa las capturas se realizan sistemáticamente utilizando distintos artes de pesca ([Figura 3.2](#)) tales como redes, agalleras, espineles y trampas de tipo garlito que se tienden a última hora de la tarde y se recogen a primera hora de la mañana siguiente. Además se realizaron barridos con red de arrastre. En esta oportunidad los muestreos se realizaron durante los días 29 y 30 del mes de Marzo de 2015.



Figura 3.2. Artes de pesca utilizadas. De izquierda a derecha, espinel, trampas, agalleras y arrastre.

Los peces capturados se llevaron inmediatamente a la costa y los músculos de la parte dorsal de ambos flancos se disectaron con instrumental de acero inoxidable, se

envolvieron separadamente en papel aluminio y se rotularon respectivamente ([Figura 3.3.](#)). Luego, se colocaron en bolsas tipo Ziploc® y se conservaron en hielo hasta su traslado al laboratorio donde se mantuvieron a -80 °C hasta su procesamiento ([USEPA, 2000](#)).



Figura 3.3. Disección de los peces en el campo

4.3. Adaptación de la metodología analítica

Durante esta etapa se trabajó en el desarrollo del método instrumental y en la optimización de la metodología de extracción para la determinación de las concentraciones de los fármacos seleccionados utilizando HPLC-ESI (+)-MS/MS.

En función de los objetivos, los tiempos de trabajo y las capacidades analíticas disponibles, se ha procedido de la siguiente manera: i) Desarrollo del método instrumental para determinar los compuestos por HPLC-ESI(+)-MS/MS. ii) Optimización del método de extracción propuesto por [Ramírez et al. \(2007\)](#).

4.3.1. Fundamento y desarrollo del método instrumental

Fundamentos

Como se mencionara previamente, la cromatografía líquida de alta eficiencia acoplada a espectrometría de masas (HPLC-MS) se ha transformado en la técnica analítica de elección para la determinación de compuestos farmacéuticos en matrices biológicas dada su alta selectividad, especificidad y sensibilidad ([Huerta et al., 2012](#)).

En particular la cromatografía líquida de alta eficiencia es un método adecuado para la separación de compuestos polares no volátiles como la mayoría de los compuestos farmacéuticos. El principio de la cromatografía líquida reside en separación mediante la afinidad diferencial de los analitos entre una fase móvil, líquida, y otra estacionaria, sólida. En particular, en la cromatografía líquida de alta eficiencia un flujo

relativamente pequeño de la fase móvil se bombea a una presión relativamente elevada a través de una columna en la que se encuentra empaquetada la fase estacionaria. La naturaleza de la fase móvil y estacionaria difiere según los analitos a separar. En el caso de los fármacos, suele utilizarse más comúnmente la cromatografía líquida en fase reversa, en la que la fase estacionaria es apolar, la móvil de polaridad moderada y el reparto de los analitos es diferencial en función de interacciones de tipo hidrofóbica. En este tipo de cromatografía, la fase estacionaria suele consistir en pequeñas partículas de sílice revestidas con C18 ($C_{18}H_{37}$) o C8 (C_8H_{17}), o diferentes variantes de esta. Por otro lado, las mezclas de agua y acetonitrilo y/o metanol suelen ser las fases móviles típicas. En general el pH de la fase móvil suele estar regulado mediante modificadores como el ácido fórmico y el acetato de amonio que luego también contribuyen en la ionización de tipo electrospray. En este tipo de cromatografía los compuestos más polares poseen tiempos de retención menores que los compuestos menos polares (Ardrey, 2003).

La espectrometría de masas es una técnica analítica que permite la identificación de la cantidad y el tipo de sustancias químicas presentes en una muestra mediante la medición de la relación carga masa y la abundancia de iones en fase gaseosa. Un espectrómetro de masa consta de tres componentes básicos, la fuente de iones, el analizador de masas y el detector (Ardrey, 2003).

La cromatografía líquida ha podido ser acoplada a espectrometría de masas gracias al desarrollo de fuentes de ionización a presión atmosférica (de su sigla en inglés: API). Las más comúnmente utilizadas son la de ionización química (de su sigla en inglés: APCI) y las de electro spray (de su sigla en inglés: ESI). En la primera un electrodo produce una descarga corona sobre un spray del solvente que transporta los analitos que es calentado y puesto en contacto con el gas de nebulización para inducir la formación de iones primarios. En modo positivo suelen protonar al analito formando el ión molecular, mientras que en modo negativo pueden tanto substraer un protón como formar aductos. En el segundo caso, bajo alto voltaje el cono de Taylor emite un chorro de pequeñas gotas del solvente transportando al analito que progresivamente se van evaporando concentrando las cargas hasta exceder el límite de Rayleigh dónde las gotas se disocian de forma explosiva (fisión Culómbica) liberando una corriente de iones cargados. En ambos casos los iones formados son enviados por diferencia de potencial y a través de un capilar al analizador de masas (Ardrey, 2003).

Los analizadores de masas separan los iones de acuerdo a su relación carga/masa (m/z). Existen diferentes tipos entre los más comúnmente utilizados son los de tiempo de vuelo (de las siglas en inglés: TOF), los cuadrupolos, y las trampas de iones. En el primero los iones son acelerados en un campo eléctrico de igual potencial y se mide el tiempo que les toma llegar al detector. En este caso los iones se separan en función de sus masas, alcanzando primero al detector los más livianos. En el caso de los cuadrupolos, utilizan campos eléctricos oscilantes para estabilizar selectivamente (o

desestabilizar) las trayectorias de los iones que pasan a través de un campo de radiofrecuencia (RF) creado por 4 varillas metálicas paralelas. Sólo los iones en un cierto rango de relación carga/masa pasan a través del sistema en cualquier momento, pero los cambios en los potenciales sobre las varillas permiten una amplia gama de valores de m/z que pueden ser barridos rápidamente, de forma continua o en una sucesión de saltos discretos. La trampa de iones trabaja en los mismos principios físicos que el cuadrupolo pero aquí los iones que llegan no son los que atraviesan el sistema sino los que quedan atrapados en la trampa y luego son expulsados secuencialmente. Los iones son atrapados en un campo de radiofrecuencia fijo en un espacio definido por un electrodo de anillo (por lo general conectado al potencial de radiofrecuencia principal) ubicado entre dos electrodos de remate (típicamente conectado a potenciales auxiliares) con corriente constante (Ardrey, 2003).

En los últimos años se han desarrollado analizadores en tándem que combinan los distintos tipos de analizadores mencionados previamente. Los más comunes pueden ser dobles cuadrupolos, un cuadrupolo seguido de un TOF o de una trampa. En la actualidad también se combinan diferentes tipos de trampas en un mismo sistema. En todos los casos se interpone entre los analizadores una celda de colisión en la que los iones se hacen colisionar con un gas que permite fragmentar un determinado ion parental en iones hijos específicos mejorando así la selectividad, especificidad y sensibilidad.

El elemento final del espectrómetro de masas es el detector. El mismo registra ya sea la carga inducida o la corriente que se produce cuando los iones pasan o golpean una superficie.

Equipo utilizado

En el presente trabajo, para la identificación y cuantificación de los fármacos estudiados, se utilizó un cromatógrafo líquido de alta eficiencia acoplado a un espectrómetro de masas cuadrupolo-trampa iónica en tándem. El equipo fue un HPLC Finnigan Surveyor con dispensador automático de muestras acoplado a un espectrómetro de masas modelo LTQ XL mediante una fuente ESI. El programa informático de control del equipo fue el HPLC-MS/MS Finnigan Surveyor MS pump plus, versión 1.01.3300, con Autosampler Plus, versión 2.01. La adquisición de datos se realizó mediante el programa Xcalibur, versión 2.0.7.

Materiales y reactivos

Se utilizó material de vidrio borosilicato (matraces, vasos de precipitado, pipetas), pipetas automáticas de P20, P200 y P1000 y jeringas de vidrio Hamilton® de 50, 100 y 200 µl.

Los principios activos de los fármacos seleccionados fueron Parafarm®, adquiridos en Droguería Saporiti.

Los solventes y sales utilizados para el análisis por HPLC-MS/MS fueron: ácido fórmico 88% pro-análisis (Cicarelli Laboratorios), agua MiliQ, metanol LC-MS (Carlo Erba), acetonitrilo HPLC-Gold-Ultragradient (Carlo Erba), formiato de amonio pureza 99% (Aldrich Chemistry)

Soluciones de trabajo

1. Soluciones patrón de los fármacos individuales (atenolol, cafeína, carbamazepina, enalapril, metformina, paracetamol y sildenafil) concentración 1000 mg/L en metanol.
2. Solución patrón de la mezcla de fármacos (atenolol, cafeína, carbamazepina, enalapril, metformina y sildenafil) 100 mg/L. Se preparó en un matraz de 5ml agregando 500 µl de la solución patrón de 1000 mg/L de cada uno de los fármacos y llevando a volumen con metanol.
3. Soluciones de trabajo de 10, 100, y 1000 µg/L de la mezcla de fármacos. A partir de una solución patrón de la mezcla se realizó una solución intermedia de 10 mg/L y luego las de trabajo mediante sucesiva diluciones 1/10 en metanol.
4. Fase móvil orgánica: se preparó agregando iguales volúmenes de acetonitrilo y metanol (50:50) y un 0,1% v/v de ácido fórmico. Fase móvil acuosa: se preparó con agua MiliQ, 0,1% v/v de ácido fórmico y 5mM de formiato de amonio.

Condiciones separativas

El método separativo empleado fue basado en el desarrollado por Elorriaga et al 2013b con las adaptaciones a los requerimientos de flujo y gradiente del equipo mencionado. Se empleó una columna de fase reversa X-Select CSH (Charged Surface Hybrid, Waters®) C-18, 75 mm x 4,6 mm x 3,5 µm a una temperatura de 35 °C. Se ensayaron distintos gradientes y flujos de una fase móvil ternaria conformada por una mezcla 50:50 de acetonitrilo-metanol con distintas proporciones de agua miliQ a lo largo de la corrida modificada con formiato de amonio 5mmolar y acidificada al 0,1% con ácido fórmico. Las condiciones separativas se ensayaron utilizando soluciones patrón individuales (solución 1) para determinar los tiempos de retención de los 6 compuestos estudiados y soluciones patrón de la mezcla de fármacos (solución 3).

Condiciones de espectrometría de masas en tándem

Dado el tiempo disponible se trabajó únicamente con la fuente de ionización en electrospray en modo de ionización positiva (ESI+). La caracterización de los espectros de masa de cada fármaco para determinar el pico base y la optimización de los parámetros para maximizar la intensidad señal y la energía de colisión para obtener los iones hijos se realizó por infusión directa. Se utilizó la optimización automática del programa y luego se realizaron ajustes manuales de los parámetros más sensibles (ej. flujos de nitrógeno (nebulización y auxiliar), temperatura de la fuente, voltaje del capilar)

4.3.2. Extracción de los fármacos de las muestras de músculo

Fundamento

El fundamento del método propuesto por [Ramírez et al. \(2007\)](#) es muy simple, se basa en una extracción sólido-líquido en la que el tejido se homogeniza en contacto con el solvente y luego ambos se mezclan en un extractor rotatorio para favorecer la difusión de los analitos desde la fase sólida a la líquida y disminuir el tiempo en que el reparto entre ambas fases alcanza el equilibrio. La constante de reparto sólido-líquido determinará la afinidad diferencial del analito entre el solvente y el tejido, por lo tanto la eficiencia de la mezcla de solventes para la extracción. Dado que los fármacos son relativamente polares y tienen un K_{ow} relativamente bajo, los solventes utilizados en la mezcla suelen ser bastante polares. Ello tiene además la ventaja de extraer poco a los lípidos presentes en los tejidos pero suele extraer mayor proporción de aminoácidos y péptidos.

Estrategia experimental

En función de los antecedentes y el principio de la técnica de extracción a emplear, se procedió a ensayar diferentes mezclas de extracción para evaluar la eficiencia de extracción de cada una utilizando muestras de músculo de sábalo. En tal sentido se probaron dos mezclas utilizadas en el trabajo de [Ramírez et al. \(2007\)](#): ácido acético-metanol y acetonitrilo-metanol, y otras no utilizadas en dicho trabajo: acetato de etilo-metanol, acetato de etilo-acetona y acetona-metanol.

Equipamiento

Las muestras se homogenizaron con un homogenizador Pro-Scientific® 200, las muestras se centrifugaron en una centrífuga refrigerada Sigma® 3-16K, la concentración se realizó en un colector Supelco® Visiprep DL conectado a una bomba

de vacío, la evaporación se realizó con un generador de nitrógeno tipo NF-2400 conectado a un compresor odontológico libre de aceite.

Materiales y reactivos

Se utilizó material de vidrio borosilicato (matraces, vasos de precipitado, pipetas). Se utilizaron tubos cónicos de 15 ml de polipropileno, filtros Cameo de jeringa de Nylon, 0,45µm (tamaño de poro) 25mm (diámetro) (Micron Separation Inc.), jeringas hipodérmicas descartables sin aguja (Neojet).

Los principios activos de los fármacos seleccionados fueron Parafarm®, adquiridos en Droguería Saporiti. Los solventes empleados para la optimización del método de extracción fueron los siguientes: metanol HPLC (J.T. Baker), acetona A.C.S (Cicarelli Laboratorios), acetato de etilo HPLC (J.T. Baker), ácido acético glacial 99.5% Pro-análisis (Cicarelli Laboratorios), acetonitrilo HPLC (J.T. Baker).

Soluciones de trabajo

1. Soluciones patrón de los fármacos individuales 1000 mg/L, solución patrón de la mezcla de fármacos 100 mg/L y soluciones de trabajo de 10, 100, y 1000 µg/L preparadas como se describió en el punto anterior.
2. Mezclas de extracción (1:1): se prepararon mezclas de ácido acético-metanol (pH: 4), acetonitrilo-metanol y acetato de etilo-acetona

Procedimiento

Preparación de las muestras

A las muestras de músculo se les saco la piel y se las cortó en pequeños cubos de aproximadamente 1 cm de lado. Luego las muestras se combinaron formando tres muestras compuestas y se homogeneizaron a 12.500 rpm en un recipiente de acero inoxidable. Finalmente fueron subdivididas en tres submuestras de 100 g cada una denominadas fracción A, B y C (Figura 3.4).



Figura 3.4. A la izquierda muestras de musculo trozada en cubos. A la derecha muestras homogeneizadas, se corresponden con las fracciones A, B y C de 100 g cada una.

La fortificación de las muestras previo a la extracción se preparó como sigue: a la fracción A (control), se le agregaron 1000 µl de metanol. A la fracción B y C se le adicionaron 100 µl y 1000 µl de la solución patrón de mezcla de estándares de concentración 100 mg/L para obtener una concentración final de 100 y 1000 µg/Kg (ng/g), respectivamente. A la fracción B se le agregaron además 900 µl de metanol.

Cada fracción se volvió a homogenizar para distribuir homogéneamente los fármacos en todo el tejido y luego se fracciona en porciones de 3 g (Figura 3.5.). Se las envolvió en papel aluminio y se las almaceno a -80°C en bolsas Ziploc®.



Figura 3.5. Homogenatos de 100 g subdivididos en porciones de 3 g

Extracción de las muestras

Para la comparación de la eficiencia de extracción entre las diferentes mezclas de extracción se ensayaron las mezclas de extracción: i) acetato de etilo-metanol, ii) acetato de etilo-acetona, iii) acetona-metanol, iv) acetonitrilo-metanol, v) ácido acético-metanol.

Para ello, una de las porciones almacenadas de cada grupo (A, B, y C) se descongeló y se subdividió en 3 porciones de 1 g (triplicados) cada una y se las colocó en un vaso de precipitado de 20 ml. A cada vaso se le agregaron 8 ml de la mezcla de extracción correspondiente. Con la ayuda de una varilla de vidrio se desmenuzaron las muestras y luego se homogenizaron a 30.000 rpm. Luego se agitaron vigorosamente por 5 min. (Figura 3.6.).

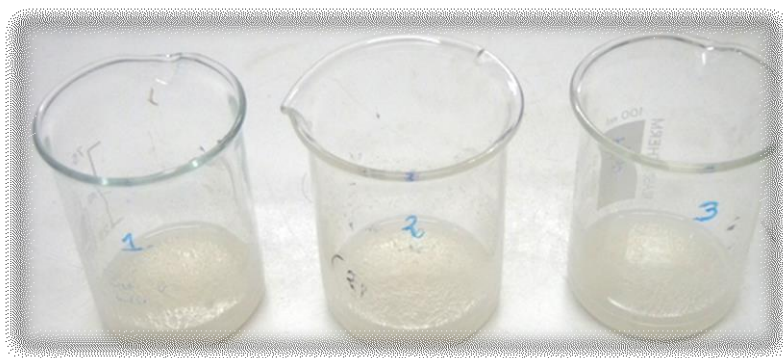


Figura 3.6. Aspecto de los homogenatos de 1 g de tejido disgregados en los solventes de extracción por triplicado.

Posteriormente, el extracto se trasvasó a un tubo cónico de centrifuga de polipropileno de 15 ml y el vaso se enjuagó con 3 contactos de 1 ml de solvente de extracción. Luego se centrifugó a 4.000 rpm durante 30 min a 4°C. El sobrenadante se trasvaso a otro tubo cónico de centrifuga de 15 ml limpio y al sedimentado se le adicionaron 2 ml de la mezcla de extracción, se colocó en vórtex y se volvió a centrifugar a 4.000 rpm durante 30 min a 4°C. El sobrenadante obtenido se trasvaso al tubo donde se encontraba el sobrenadante de la primera centrifugación (Figura 3.7.). Luego para las mezclas se concentraron hasta 0,5 ml pro vacío en un colector de 40psi. Las muestras se trasvasaron posteriormente a un eppendorf de 2 ml y se llevaron a -20°C por 24 h. Luego se centrifugaron a 20.000 g durante 30 min, el sobrenadante se trasvasó a otro eppendorf y los extractos se llevaron a sequedad con corriente de N₂. Seguido, se resuspendieron en 500 µl de fase orgánica, se los filtró a través de un cameo de 0,45 µm y se los recogió en un vial para cromatografía de 2ml. Así se conservaron -20°C hasta el momento de su análisis, cuando se tomaron 200 µl del extracto en fase orgánica y se mezclaron 200 µl de la fase acuosa.

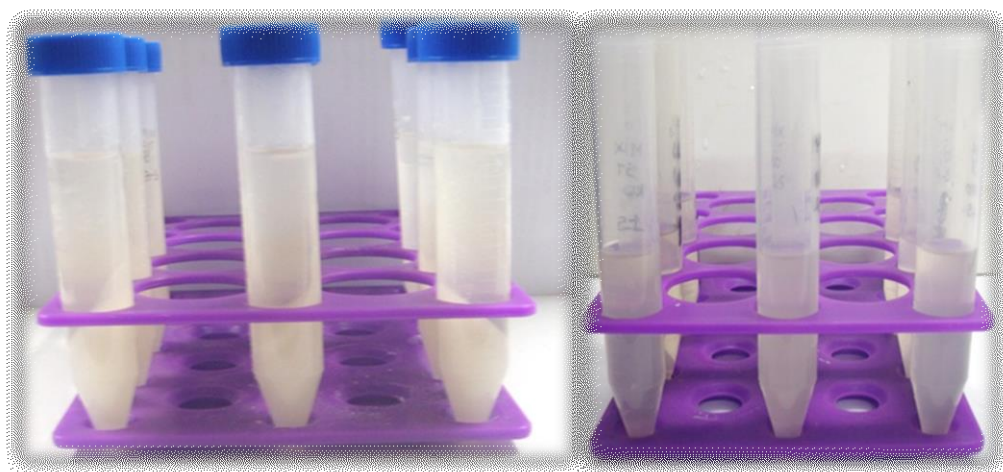


Figura 3.7. Extractos luego de la centrifugación a 4.000rpm durante 30 min a 4°C y sobrenadantes trasvasados.

Evaluación del efecto matriz

Para la fortificación de extractos utilizados para el efecto matriz, los extractos control de sábalo, obtenidos como se describió previamente, fueron sobreagregados con la solución de trabajo de mezcla de fármacos. Para ello, a 90 µl del extracto reconstituido en fase móvil se le agregaron 10 µl de la solución de trabajo de mezcla de fármacos de 1000, 100 y 10 µg/L, para obtener fortificaciones de 100, 10 y 1 µg/L.

4.4. Determinación de los compuestos farmacéuticos seleccionados en tejido de peces.

La concentración de los compuestos farmacéuticos estudiados en las muestras de músculo de las especies de peces seleccionadas se realizó utilizando las mezclas de extracción que resultaron más eficientes aplicando los procedimientos mencionados en las secciones anteriores.

4.5. Obtención y análisis de datos

Los espectros de masa de cada fármaco y de sus patrones de fragmentación para determinar los iones precursores e hijos se realizó por adquisición “on line” utilizando el programa Xcalibur, versión 2.0.7. Éste mismo programa fue utilizado para la adquisición de las intensidades iónicas y los tiempos de retención de cada uno de los m/z de cuantificación empleados para cada fármaco presente en las diferentes muestras analizadas.

La identificación los fármacos se realizó en base al ion de cuantificación y los tiempos de retención obtenidos para cada uno. La cuantificación se realizó en base a los valores de cuentas de área bajo los picos cromatográficos de cada fármaco.

Las curvas de calibración para el método instrumental se construyeron mediante regresión lineal entre los valores de concentración y las áreas respectivas de patrones de 1, 10, 100 y 1000 µg/L preparados en metanol luego de substraer el área de los blancos. En cada caso se obtuvo la pendiente (forzando el origen a cero) y el coeficiente de correlación (r^2) utilizando el programa Excel. La linealidad se determinó a partir del mejor coeficiente de correlación obtenido incluyendo o excluyendo el patrón de 1000 µg/L del análisis. Los límites de detección (LD) y cuantificación (LC) instrumentales se calcularon como 3 y 10 veces la desviación estándar del patrón más baja que dio un área reproducible (ICH, 2005).

La reproducibilidad del método instrumental se expresó como el coeficiente de variación promedio obtenido de los coeficientes de variación de cada una de las cuatro

concentraciones patrón mencionadas medidas en los diferentes días que llevó el estudio. Cada día se realizaron al menos tres curvas de calibración y todas las determinaciones se realizaron en cuatro días de equipo. La reproducibilidad de las extracciones y los análisis de efecto matriz se expresaron como el coeficiente de variación entre tres réplicas de un mismo tratamiento.

La eficiencia del método de extracción se estimó como el porcentaje de recuperación calculado a partir del cociente entre el área obtenida en el extracto de una muestra de músculo fortificada a un nivel de concentración dado previo a su extracción y el área del patrón correspondiente en metanol.

El efecto matriz sobre la ionización de los compuestos estudiados, se estimó como el cociente entre el área del extracto fortificado a un nivel de concentración dado y el área del patrón correspondiente en metanol.

La cuantificación de las muestras se realizó por el método de fortificación. Para ello, el extracto de músculo de cada especie obtenido a partir de las mezclas de extracción seleccionadas se fortificó como se describió anteriormente y se construyeron las curvas de calibración en función de la concentración de fortificación (1, 10 y 100 $\mu\text{g/L}$) y el área obtenida, restando el área obtenida en el mismo extracto sin fortificar. En este caso se obtuvieron tanto la pendiente como la ordenada al origen y el coeficiente de correlación utilizando el programa Excel. Los límites de detección (LDM) y cuantificación (LCM) del método se calcularon como 3 y 10 veces la desviación estándar del extracto fortificado a la concentración más baja que arrojó un área reproducible.

Los datos de concentración se expresan como $\mu\text{g/Kg}$ (ng/g) de peso húmedo.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la presente sección se resumen los resultados obtenidos del desarrollo del método instrumental, la optimización del método de extracción y los valores de concentración de los fármacos estudiados en las muestras de tejido muscular de las especies de peces seleccionadas y capturadas en el Río Uruguay.

5.1. Método instrumental para el análisis de los fármacos estudiados por HPLC-MS/MS

En un compromiso entre simetría, ancho de pico y tiempo de corrida, se desarrolló un método de elución en gradiente con un tiempo total de corrida de 10 min, partiendo de 50 % de fase orgánica (ACN/MeOH) hasta alcanzar el 100% a los 8 minutos y luego volviendo al estado inicial, manteniéndolo así hasta estabilizar la presión antes de la inyección de la próxima muestra. Las etapas del gradiente y el flujo se muestran en la tabla [Tabla 4.1](#). La temperatura del horno de la columna se mantuvo a 35°C.

Tabla 4.1. Programa de elución en gradiente

Tiempo (min)	Fase acuosa (%)	Fase orgánica (%)	Flujo (ml/min)
0	50	50	0,2
1	50	50	0,2
6	0	100	0,2
8	0	100	0,2
9	50	50	0,2
10	50	50	0,2

Los principales parámetros optimizados de la fuente de ionización fueron: el flujo de gas de nebulización a 15 ml/s, el flujo de gas auxiliar a 2 ml/s, el voltaje de ionización: 4.9 Kvm, la temperatura del capilar 290°C y el voltaje de la lente del tubo a 55V. Los iones precursores, los iones hijos, el tiempo de retención y la energía de colisión de cada uno de los compuestos farmacéuticos estudiados se muestran en la [Tabla 4.2](#).

Tabla 4.2. Iones parentales, iones de fragmentación, tiempos de retención y Energía de colisión de los compuestos estudiados

<i>Compuesto</i>	<i>Ion Precursor</i>	<i>Energía de Colisión (eV)</i>	<i>Iones hijo</i>	<i>Tiempo de retención (min)</i>
Atenolol	267 [M+H] ⁺	-27	225-190	2,98
Cafeína	195 [M+H] ⁺	-29	138	3,91
Carbamazepina	237 [M+H] ⁺	-27	194	7,61
Enalapril	377 [M+H] ⁺	-22	311-377	5,64
Metformina	130 [M+H] ⁺	-24	60-85	2,92
Paracetamol	152 [M+H] ⁺	-27	110	3,20
Sildenafil	475 [M+H] ⁺	-40	303-234	5,78

En la [Figura 4.1](#) se muestra, a modo de ejemplo, un cromatograma de un estándar de 100 µg/L de cada uno de los compuestos farmacéuticos estudiados. En el mismo puede observarse que si bien alguno de los compuestos no se resuelven completamente, los mismos pueden ser analizados perfectamente debido a que son analizados por canales diferentes. Los tiempos de retención obtenidos están comprendidos entre los 3 a los 8 minutos y el orden de elución ha sido metformina, paracetamol, cafeína, atenolol, enalapril, sildenafil y carbamazepina. Los compuestos que generaron mayor intensidad de iones son el atenolol y la carbamazepina, mientras que el paracetamol y la cafeína mostraron las peores intensidades y relaciones señal ruido.

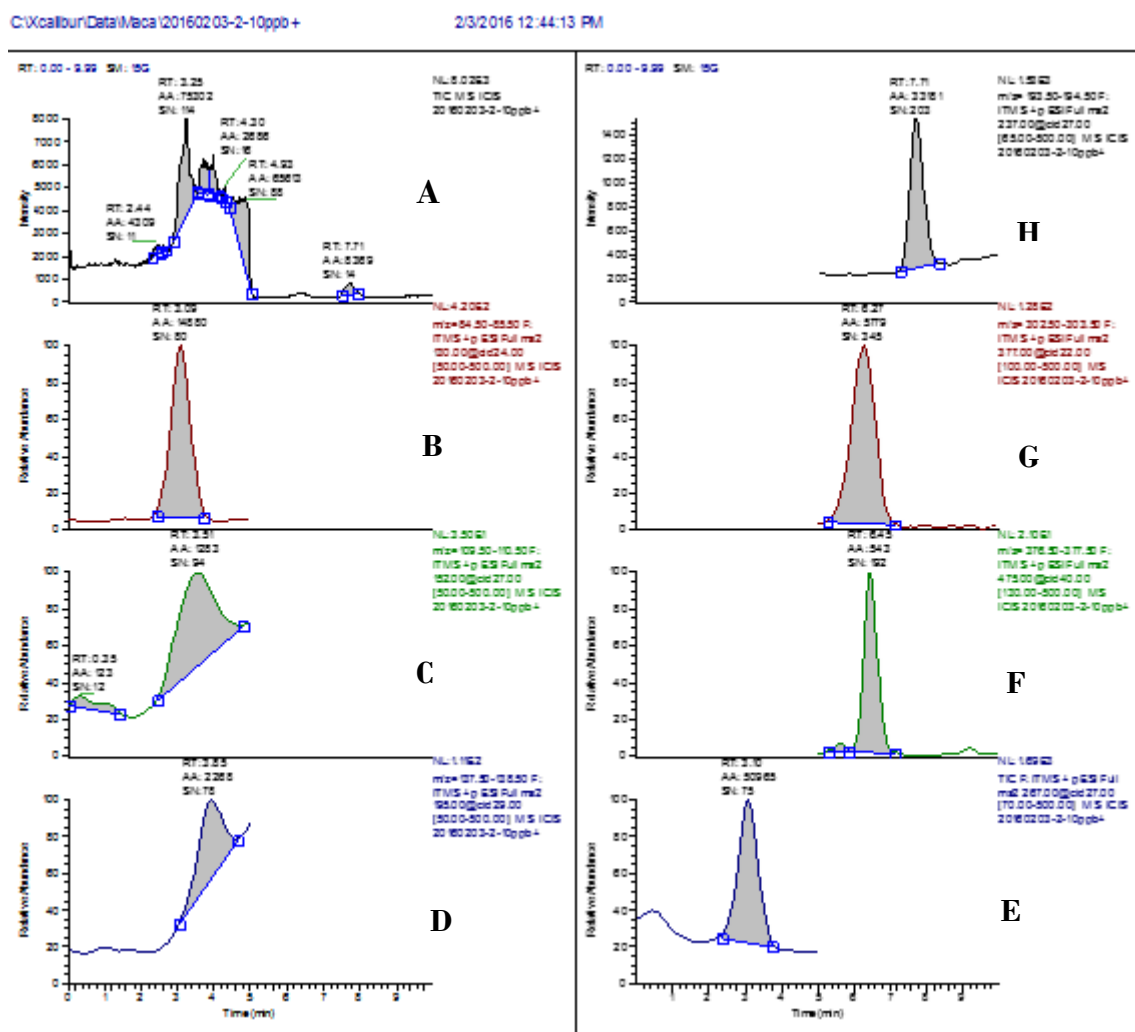


Figura 4.1. Cromatograma representativo de una mezcla de estándares de 100 µg/L. A: Cuenta total de iones (TIC); B: metformina (m/z 130 → 85); C: paracetamol (m/z 152 → 110); D: cafeína (m/z 195 → 138); E: atenolol (m/z 267 → 225); F: sildenafil (m/z 475 → 377); G: enalapril (m/z 377 → 303); H: carbamazepina (m/z 237 → 194);).

En la [Tabla 4.3](#) se muestran los datos de área promedio y desvíos estándares obtenidos para los patrones de diferente concentración utilizados para la construcción de las

curvas de calibración. También se muestran la precisión expresada como el coeficiente de variación, el rango lineal, el coeficiente de correlación, los límites de detección y cuantificación obtenidos.

Tabla 4.3. Curvas de calibración de estándares y parámetros descriptores del método instrumental.(ppb=μg/L; pendiente=abundancia relativa.L/ μg)

Atenolol

Estándar (ppb)	Área	±	σ				
1	812	±	2.056	CV:	15%	LD (ppb):	1,1
10	58.099	±	18.023	Linealidad (ppb):	0-1000	LC (ppb):	3,8
100	494.000	±	139.326	r ² :	0,999		
1000	2.377.346	±	401.879	Pendiente:	2636,8		

Cafeína

Estándar (ppb)	Área ¹	±	σ				
1	ND			CV:	6%	LD (ppb):	2,7
10	4.113	±	1.871	Linealidad (ppb):	0-1000	LC (ppb):	8,8
100	22.126	±	2.804	r ² :	0,998		
1000	164.020	±	41.439	Pendiente:	113,1		

Carbamazepina

Estándar (ppb)	Área	±	σ				
1	1.913	±	1.215	CV:	14%	LD (ppb):	0,4
10	69.013	±	19.304	Linealidad (ppb):	0-1000	LC (ppb):	1,2
100	534.125	±	64.432	r ² :	0,999		
1000	5.995.585	±	1.332.701	Pendiente:	5989,2		

Enalapril

Estándar (ppb)	Área	±	σ				
1	ND			CV:	22%	LD (ppb):	0,5
10	13.333	±	2.960	Linealidad (ppb):	0-1000	LC (ppb):	1,7
100	131.525	±	34.244	r ² :	0,999		
1000	890.070	±	179.681	Pendiente:	603,9		

Metformina

Estándar (ppb)	Área	±	σ				
1	ND			CV:	20%	LD (ppb):	2,3
10	18.680	±	4.591	Linealidad (ppb):	0-100	LC (ppb):	7,8
100	164.809	±	28.023	r ² :	0,999		
1000	882.140	±	125.363	Pendiente:	1304,7		

Paracetamol

Estándar (ppb)	Área	±	σ				
1	ND			CV:	11%	LD (ppb):	3,5
10	4.414	±	5.869	Linealidad (ppb):	0-1000	LC (ppb):	11,7
100	11.201	±	2.980	r ² :	0,998		
1000	95.386	±	12.552	Pendiente:	85,8		

Sildenafil

Estándar (ppb)	Área	±	σ				
1	ND			CV:	12%	LD (ppb):	0,5
10	2.249	±	790	Linealidad (ppb):	0-1000	LC (ppb):	1,7
100	8.389	±	2.825	r ² :	0,999		
1000	75.933	±	23.765	Pendiente:	260,6		

¹ Área promedio inter-días (para áreas individuales y gráficos de curvas de calibración ver Anexos)

De la tabla anterior se observa que el intervalo lineal obtenido estuvo comprendido entre 0 y 1000 µg/L para todos los compuestos con un coeficiente de correlación mayor al coeficiente de correlación crítico de $r=0,950$, para un $N=4$ y $\alpha=0,05$, excepto para metformina que saturó la señal más allá de 100 µg/L. Los coeficientes de variación inter-diarios estuvieron comprendidos entre 6 y 22% mostrando una precisión aceptable. Los límites de detección (LD) y cuantificación (LC) se hallaron entre 0,4 - 3,5 µg/L (ng/g) y 1,2 - 11,7 µg/L (ng/g), respectivamente

La comparación del método cromatográfico con otros hallados en la bibliografía resulta complejo debido a las diferentes columnas, solventes, modificadores y gradientes utilizados, pero para el orden de elución del atenolol, cafeína y carbamazepina, se encuentra una concordancia con el trabajo de [Ramírez et al. \(2007\)](#) et al 2007 exceptuando el atenolol y la cafeína que eluyen invertidos. Por otro lado, el orden de elución para paracetamol, cafeína, atenolol y carbamazepina es el mismo que el reportado por [Barron et al. \(2008\)](#).

En cuanto a los iones parentales y los productos de fragmentación de los compuestos estudiados, se observa que los iones de fragmentación son en general coincidentes con los documentados en la bibliografía, a excepción del ion hijo del parental del atenolol (m/z 267) que no coinciden con el reportado por [Ramírez et al. \(2007\)](#), en el cual se identificó el m/z 145 en lugar del m/z 225 como en el presente trabajo. En este sentido es sabido que las diferentes geometrías de las celdas y diferencias en las energías de colisión pueden brindar fragmentos diferentes de un equipo a otro.

Los límites de detección instrumentales suelen no ser publicados. Afortunadamente, en el trabajo de [Ramírez et al. \(2007\)](#) fueron reportados tanto los límites instrumentales de detección como el de cuantificación, siendo respectivamente: 0,48 y 1,42 para el paracetamol, 0,34 y 1,15 para la cafeína y 0,03 y 0,54 para la carbamazepina. Tales límites estuvieron en el mismo orden que los hallados en el presente trabajo, a excepción de los de la carbamazepina que fueron casi un orden más bajo. Sin embargo podemos considerar los límites instrumentales obtenidos como satisfactorios.

5.2.Eficiencia de las mezclas de extracción

Los resultados obtenidos de los ensayos de recuperación para las mezclas de extracción estudiadas se muestran en la [Tabla 4.4](#). Como puede observarse, las mezclas de extracción correspondientes a acetonitrilo-metanol y acetato de etilo-acetona presentaron los porcentajes de recuperación más elevados respecto a las otras mezclas de extracción, principalmente en lo que refiere a la cafeína, carbamazepina y enalapril.

Tabla 4.4. Recuperaciones obtenidas a partir de las diferentes mezclas de extracción (ppb=µg/Kg)

	Atenolol	Cafeína	Carbamazepina	Enalapril	Metformina	Paracetamol	Sildenafil
Acetato de Etilo-Metanol							
- Sobreagregado 100 ppb							
Área promedio	18.477	23.256	2.326.999	363.738	0	0	1.923
CV ¹	43%	68%	80%	60%	---	---	41%
Recuperación_min	2,6%	55%	188%	160%	0%	0%	16%
Recuperación_max	4,9%	155%	678%	393%	0%	0%	30%
- Sobreagregado 1000 ppb							
Área promedio	10.376	20.144	1.851.328	267.829	0	4.142	1.375
CV	11%	24%	55%	32%	---	39%	35%
Recuperación_min	0,4%	9,3%	19%	23%	0%	3,1%	1,2%
Recuperación_max	0,5%	13%	43%	37%	0%	5,6%	2,0%
Acetato de etilo-Acetona							
- Sobreagregado 100 ppb							
Área promedio	6.060	5.757	308.889	54.437	0	0	304
CV	30%	13%	26%	3%	---	---	20%
Recuperación_min	0,9%	22%	47%	40%	0%	0%	2,8%
Recuperación_max	1,4%	29%	74%	42%	0%	0%	4,2%
- Sobreagregado 1000 ppb							
Área promedio	57.190	45.662	3.589.373	525.295	56.759	8.024	1.500
CV	19%	9,1%	33%	15%	22%	3,4%	59%
Recuperación_min	1,6%	22%	48%	52%	7,3%	8,1%	0,9%
Recuperación_max	2,5%	26%	87%	68%	4,9%	8,7%	2,7%
Acetona-Metanol							
- Sobreagregado 100 ppb							
Área promedio	0	4.577	355.024	29.529	0	208.224	502
CV	---	46%	42%	89%	---	54%	52%
Recuperación_min	0%	4,4%	43%	10%	0%	701%	2,4%
Recuperación_max	0%	23%	82%	45%	0%	2652%	8,2%
- Sobreagregado 1000 ppb							
Área promedio	15.871	21.069	2.901.128	405.086	0	6.189	5.401
CV	29%	30%	26%	21%	---	31%	61%
Recuperación_min	0,5%	8,3%	39%	39%	0%	0,0%	3,6%
Recuperación_max	0,8%	13%	57%	52%	0%	4,1%	9,2%
Acetonitrilo-Metanol							
- Sobreagregado 100 ppb							
Área promedio	9.531	9.331	843.965	114.911	0	0	2.174
CV	55%	64%	26%	56%	---	---	82%
Recuperación_min	0,8%	22%	123%	49%	0%	0%	11%
Recuperación_max	2,9%	73%	180%	142%	0%	0%	49%
- Sobreagregado 1000 ppb							
Área promedio	19.032	21.801	2.805.643	255.585	82.929	3.711	7.398
CV	30%	17%	46%	36%	27%	15%	3,0%
Recuperación_min	0,8%	12%	34%	23%	7,1%	3,9%	8,3%
Recuperación_max	1,1%	15%	77%	44%	12%	4,7%	8,7%
Ácido acético-Metanol							
- Sobreagregado 100 ppb							
Área promedio	18.970	13.283	1.624.932	171.212	0	4.033	4.087
CV	10%	5%	11%	7%	---	58%	15%
Recuperación_min	1%	10%	-13%	23%	0%	19%	6,8%
Recuperación_max	1%	15%	52%	42%	0%	59%	21%
- Sobreagregado 1000 ppb							
Área promedio	24.946	11.078	1.344.790	122.198	0	0	3.173
CV	25%	13%	18%	23%	---	---	14%
Recuperación_min	0,2%	-0,3%	-5%	-2%	0%	0,0%	-0,1%
Recuperación_max	0,7%	1,0%	4%	4%	0%	0%	0,9%

¹ Coeficiente de variación de la recuperación calculado en base a 3 extractos diferentes

En función de los coeficientes de variación, la mezcla de acetato de etilo-acetona presentó una mejor reproducibilidad con valores entre el 3 y el 33%. Para la mezcla de acetonitrilo-metanol, la recuperación promedio de la carbamazepina fue 103%, para el enalapril 64,5%, para cafeína 30,5%, para sildenafil 19,25% y 3,2 para atenolol. En el caso de la mezcla de acetato de etilo-metanol, los mayores valores de recuperación los presentó la carbamazepina con un promedio del 64%, seguido del enalapril con 50,5%, la cafeína con 24,75%, el sildenafil con 2,65% y finalmente el atenolol con 1,6%. Para la metformina y el paracetamol se obtuvieron valores de recuperación sólo para los sobreagregados de 1000 µg/kg, siendo de 9,5% y 4,3% para la mezcla de acetonitrilo metanol y 6,1% y 8,4% para la de acetato de etilo - acetona, respectivamente.

Los valores de recuperación para la carbamazepina, paracetamol, atenolol y cafeína publicados en el trabajo de [Ramírez et al. \(2007\)](#) estaban comprendidos entre 97 y 82% para las mezclas acetonitrilo-metanol y para ácido acético-metanol. A excepción del valor obtenido para la carbamazepina, tales valores son sustancialmente mayores que los obtenidos en el presente trabajo utilizando la mezcla de extracción acetonitrilo-metanol. Por otro lado la mezcla de ácido acético-metanol arrojó valores muy por debajo de los hallados por [Ramírez et al. \(2007\)](#). Tal diferencia podría deberse a que al momento de concentrarse los extractos de ácido acético-metanol formaban un precipitado blanco abundante que debía ser filtrado y probablemente arrastrara los fármacos con él. Tal inconveniente de la mezcla de extracción no fue reportado por [Ramírez et al. \(2007\)](#).

5.3.Efecto matriz, reproducibilidad y sensibilidad del método

Los resultados del análisis del efecto matriz, la reproducibilidad y la sensibilidad del método se muestran en la [Tabla 4.5](#).

Los valores de supresión iónica obtenidos han sido muy variables dependiendo del compuesto. En promedio, la mezcla de extracción de acetato de etilo-acetona indujo un menor efecto matriz que la mezcla de acetonitrilo-metanol. En la primera, los valores oscilaron entre el 18 y el 100%. Los compuestos que menos supresión iónica presentaron fueron el enalapril (21,2 %), la cafeína (40,5) y la carbamazepina (50,5%), mientras que el paracetamol fue el compuesto más afectado con un 100% de supresión. Estos resultados indicarían que los bajos valores de recuperación no estarían ligados tanto a la eficiencia de la extracción, sino que estarían explicados principalmente por la supresión iónica.

Tabla 4.5. Supresión iónica y límites de detección y cuantificación del método.(a=abundancia relativa.L/μg; b=abundancia reativa; ppb= μg/L)

Mezcla extracción	Conc. (ppb)	Área estándar (metanol)	Área extracto sobreagregado (subst. ctrl.)		Supresión (%)	Curva calibración sobre extracto			Límites	
			Promedio	SD%		a	B	r ²	LD	LC
Atenolol										
Acetonitrilo/ metanol	1	6.541	-9	26%	100,1%	15,1	8,0	0,998	10,0	33,4
	10	28.991	204	14,3%	99,3%					
	100	284.331	1.518	28,1%	99,5%					
Acetato de etilo/ acetona	1	6.541	0	---	100,0%	47,3	22,7	0,999	9,6	32,0
	10	28.991	598	25,4%	97,9%					
	100	284.331	4.740	17,6%	98,3%					
Cafeína										
Acetonitrilo/ metanol	1	288	7	13,3%	97,7%	20,4	50,0	0,991	14,7	49,0
	10	1.124	385	25,0%	65,7%					
	100	9.328	2.075	27,8%	77,8%					
Acetato de etilo/ acetona	1	288	227	10,8%	21,3%	41,3	124,8	0,998	2,1	7,0
	10	1.124	610	10,9%	45,7%					
	100	9.328	4.248	3,8%	54,5%					
Carbamazepina										
Acetonitrilo/ metanol	1	414	65	22,7%	84,4%	430	1068,0	0,989	23,4	77,9
	10	26.749	8.473	25,9%	68,3%					
	100	429.037	43.867	22,8%	89,8%					
Acetato de etilo/ acetona	1	414	329	20,0%	20,7%	1047	217,5	0,999	0,9	2,9
	10	26.749	11.960	26,6%	55,3%					
	100	429.037	104.813	22,1%	75,6%					
Enalapril										
Acetonitrilo/ metanol	1	417	0	---	100,0%	291	-976,0	0,992	23,4	77,9
	10	4.313	90	40,1%	97,9%					
	100	57.187	28.251	14,0%	50,6%					
Acetato de etilo/ acetona	1	417	22	20,0%	24,6%	471	-559,6	0,999	5,5	18,5
	10	4.313	3.416	25,2%	20,8%					
	100	57.187	46.699	27,1%	18,3%					
Metformina										
Acetonitrilo/ metanol	1	4.449	283	33,3%	93,6%	36,2	195,0	0,993	6,4	21,2
	10	10.216	716	8,4%	93,0%					
	100	130.723	3.798	17,7%	97,1%					
Acetato de etilo/ acetona	1	4.449	185	11,5%	95,8%	67,3	64,4	0,999	3,2	10,5
	10	10.216	750	9,4%	92,7%					
	100	130.723	6.790	22,3%	94,8%					
Paracetamol										
Acetonitrilo/ metanol	1	744	0	---	100,0%	---	---	---	---	---
	10	1.725	0	---	100,0%					
	100	7.755	0	---	100,0%					
Acetato de etilo/ acetona	1	744	0	---	100,0%	---	---	---	---	---
	10	1.725	0	---	100,0%					
	100	7.755	0	---	100,0%					
Sildenafil										
Acetonitrilo/ metanol	1	365	36	10,8%	90,1%	2,9	21,1	0,988	13,9	46,2
	10	2.963	60	17,3%	98,0%					
	100	25.073	308	22,4%	98,8%					
Acetato de etilo/ acetona	1	365	50	20,0%	86,3%	7,6	17,2	0,997	3,2	10,5
	10	2.963	85	21,0%	97,1%					
	100	25.073	778	19,9%	96,9%					

El efecto matriz observado en el presente estudio fue muy superior al reportado por [Ramírez et al. \(2007\)](#) en el cual oscilaron entre -12% y +8%. La influencia de la matriz sobre la ionización en fuentes de tipo electrospray es bien conocida y ha sido discutida por varios autores ([Huerta et al., 2012](#)). Efectos marcados como los observados en el presente estudio han sido descritos en otros trabajos ([Schlüsener and Bester, 2005](#)) donde se proponen como alternativas la utilización de patrones internos, fortificado de las muestras o dilución isotópica. Es importante resaltar que estos métodos compensan el efecto matriz pero no lo reducen y por consiguiente ello redundará en una pérdida de sensibilidad con el consecuente aumento de los límites de detección.

Dado que los patrones internos suelen comportarse de forma diferente que los compuesto analizados y que no se cuenta con patrones isotópicamente marcados de todos los analitos estudiados, se ha optado por el método de fortificado. En la [Figura 4.2](#) se muestra un cromatograma representativo de una muestra sobreagregada con un patrón de 100 µg/L de cada fármaco. Si bien de esta manera se ha logrado cuantificar los fármacos de manera confiable, en el futuro se requerirá optimizar una técnica de “clean up” del extracto y/o extender el tiempo de corrida cromatográfica a fin de reducir la co-elución de varios compuestos y así reducir los límites de detección. Alternativamente se podrá evaluar una metodología de extracción alternativa que genere un extracto más “limpio”.

En cuanto a la reproducibilidad del método fue aceptable con un valor promedio de desviación estándar de 20,1%. Los límites de detección y cuantificación del método obtenidos mediante fortificación indican que a partir de las extracciones con la mezcla de acetato de etilo-acetona se obtienen límites más bajos. Los valores oscilaron entre 0,9-9,6 y 2,9-32,0 µg/Kg (ng/g), siendo la carbamazepina y el atenolol el más y menos sensible, respectivamente. Para el paracetamol no se obtuvo un límite debido a la completa supresión iónica observada para este compuesto. En comparación con los límites de detección del método presentado por [Ramírez et al. \(2007\)](#) para la carbamazepina (0,54 ng/), el atenolol (1,48 ng/g), la cafeína (3,93 ng/g) se observa que los valores se encuentran prácticamente en el mismo orden. Estos límites son, sin embargo, bastante más elevados que los obtenidos mediante métodos más sofisticados que utilizan extracción líquida presurizada (PLE) seguida de “clean-up” con alúmina y cromatografía de permeación en gel ([Huerta et al., 2013](#)).

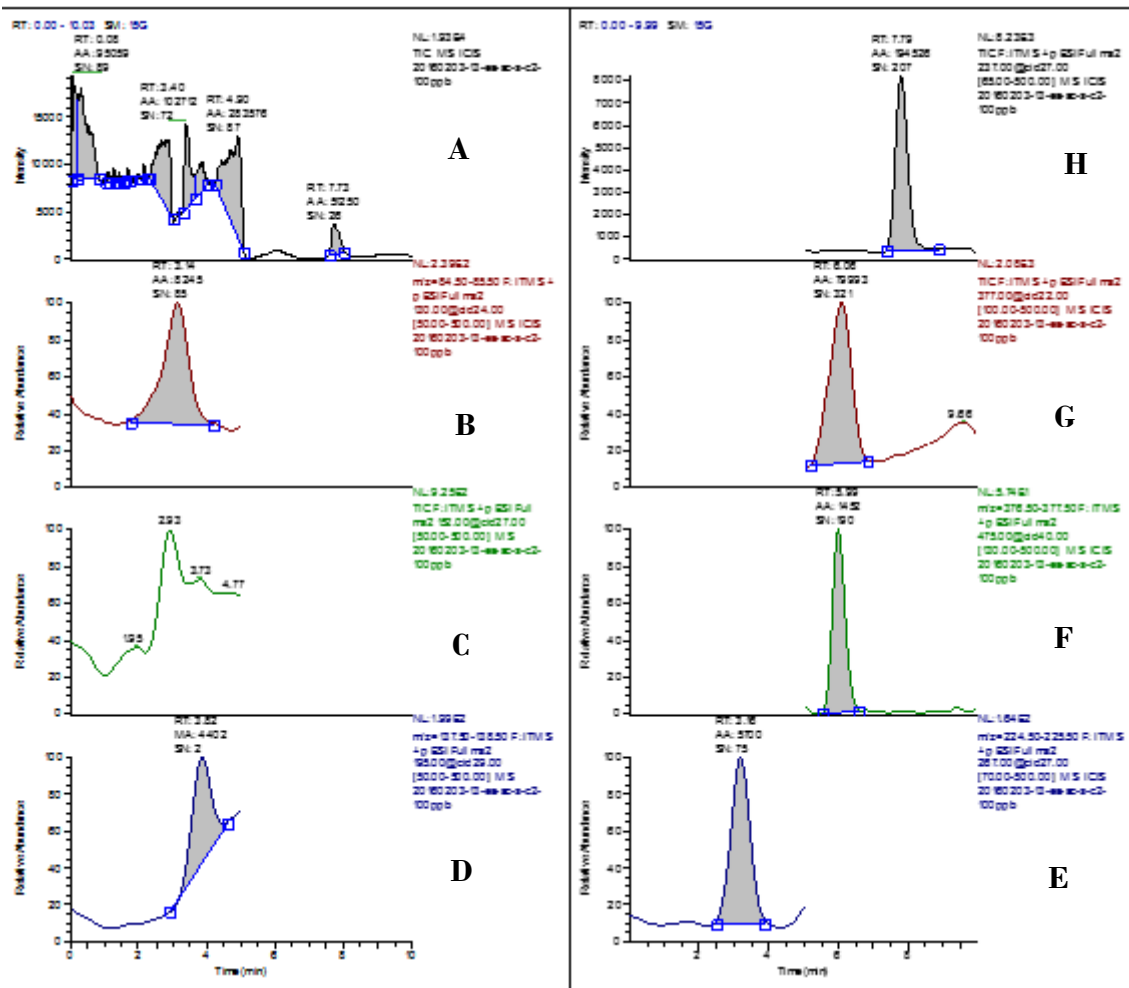


Figura 4.2. Cromatograma representativo de un extracto de músculo de sábalo fortificado con 100 µg/L de solución compuesta de los patrones de los fármacos estudiados. El orden de los compuestos es el mismo que el de la Figura 4.1.

5.4. Determinación de atenolol, carbamazepina, cafeína, sildenafil, enalapril y metformina en muestras ambientales

Las concentraciones de los fármacos estudiados en las muestras de músculo de las especies de peces Parano-Platenses de interés comercial y para el consumo obtenidas en el Bajo Uruguay se muestran en la [Tabla 4.6](#). De la misma se desprende que los límites de detección obtenidos con la mezcla de acetonitrilo-metanol no son lo suficiente sensibles para detectar los fármacos estudiados en el músculo de las especies seleccionadas arrojando valores de ocurrencia muy bajos (máxima 33%) y no permitiendo en ningún caso cuantificar. Por otro lado, la sensibilidad obtenida con la mezcla de acetato de etilo-acetona ha permitido un porcentaje mayor de detección (máxima 100%) y en varios casos cuantificar las concentraciones de los fármacos en el músculo de las especies estudiadas.

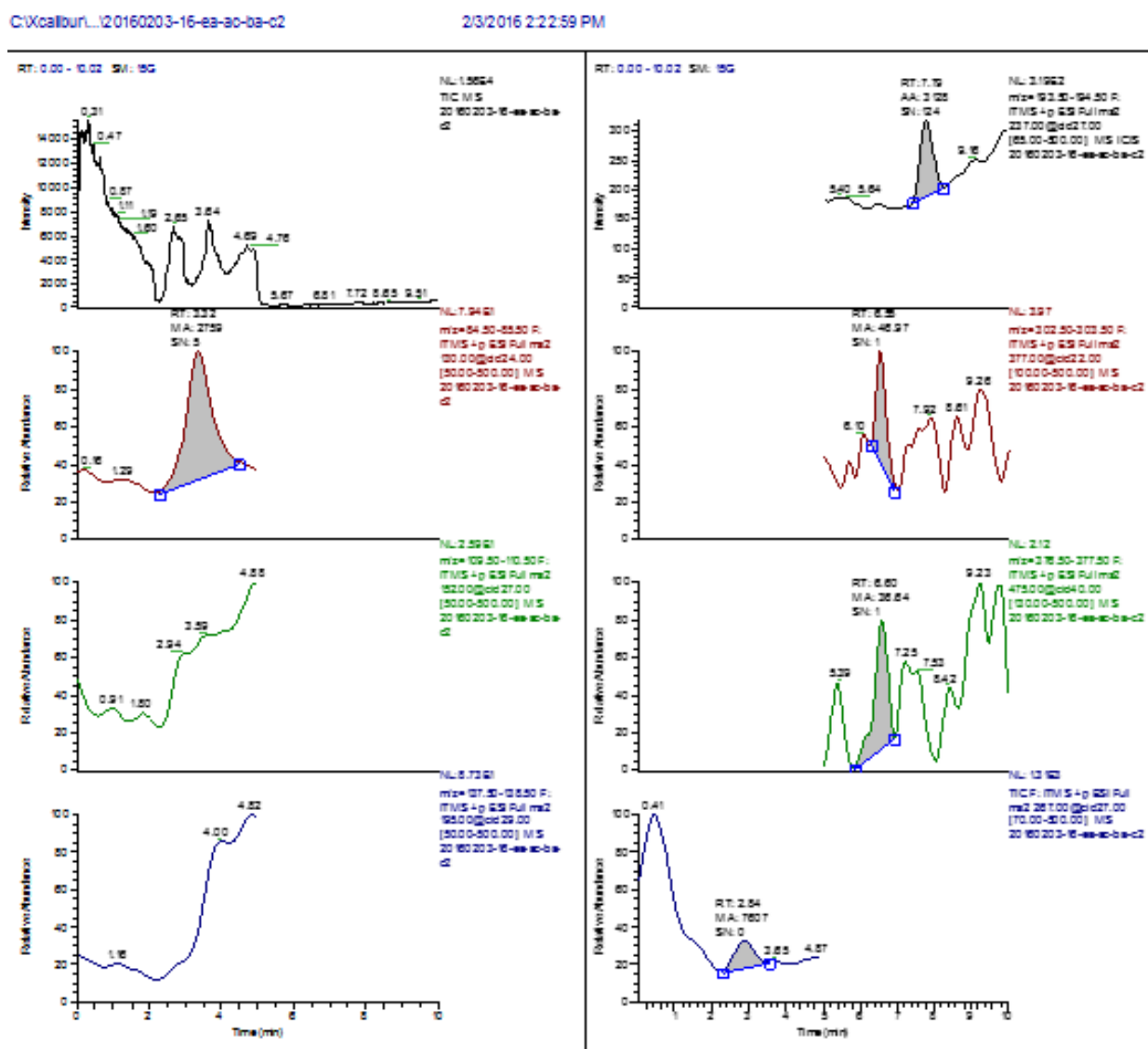
Atenolol fue el fármaco que mostró las concentraciones más elevadas, con valores mayores a 100 µg/Kg (ng/g) junto a una alta detectabilidad presentando al menos un valor en cada especie. En el caso de la carbamazepina, se ha detectado en todas las muestras pero los niveles fueron cuantificables sólo en una especie, el dorado a niveles de 56 µg/Kg (ng/g). La metformina es el fármaco que sigue en niveles de concentración y detectabilidad, seguida por el sildenafil y la cafeína. Pese a no ser el fármaco con mayores límites de detección, el enalapril ha sido el único fármaco que no pudo ser detectado a partir de ninguna de las mezclas de extracción utilizadas.

Tabla 4.6. Concentraciones (µg/Kg) de los fármacos estudiados en los músculos de las especies de peces Parano-Platenses de importancia pesquera y para el consumo seleccionados.

	Acetonitrilo-Metanol						Acetato de etilo-Acetona					
	Muestra compuesta			Media	DS	Det	Muestra compuesta			Media	DS	Det
	1	2	3				1	2	3			
Atenolol						33%				191,6	44,0	83%
Bagre Amarillo	DNC	ND	ND	---	---		206,2	160,3	DNC	183,3	32,4	
Boga	ND	DNC	ND	---	---		ND	ND	134,9	134,9	---	
Dorado	ND	ND	DNC	---	---		254,8	256,0	204,5	238,4	29,4	
Sábalo	ND	DNC	ND	---	---		313,0	39,4	276,7	209,7	148,6	
Cafeína						8%				15,5	2,2	33%
Bagre Amarillo	ND	ND	ND	---	---		15,9	9,1	26,0	17,0	8,5	
Boga	ND	ND	ND	---	---		ND	ND	13,9	13,9	---	
Dorado	DNC	ND	ND	---	---		ND	ND	ND	---	---	
Sábalo	ND	ND	ND	---	---		ND	ND	ND	---	---	
Carbamazepina						17%				56,0	---	100%
Bagre Amarillo	ND	ND	ND	---	---		DNC	DNC	DNC	---	---	
Boga	ND	ND	ND	---	---		DNC	DNC	DNC	---	---	
Dorado	ND	ND	ND	---	---		6,0	151,9	10,2	56,0	---	
Sábalo	ND	DNC	DNC	---	---		DNC	DNC	DNC	---	---	
Enalapril						0%						0%
Bagre Amarillo	ND	ND	ND	---	---		ND	ND	ND	---	---	
Boga	ND	ND	ND	---	---		ND	ND	ND	---	---	
Dorado	ND	ND	ND	---	---		ND	ND	ND	---	---	
Sábalo	ND	ND	ND	---	---		ND	ND	ND	---	---	
Metformina						0%				27,8	6,9	67%
Bagre Amarillo	ND	ND	ND	---	---		17,9	40,0	44,8	34,3	14,3	
Boga	ND	ND	ND	---	---		ND	ND	ND	---	---	
Dorado	ND	ND	ND	---	---		ND	DNC	28,76	28,8	---	
Sábalo	ND	ND	ND	---	---		22,1	23,6	15,6	20,5	4,3	
Sildenafil						8%				24,4	---	42%
Bagre Amarillo	ND	ND	ND	---	---		DNC	ND	ND	---	---	
Boga	ND	DNC	ND	---	---		ND	ND	ND	---	---	
Dorado	ND	ND	ND	---	---		DNC	ND	ND	---	---	
Sábalo	ND	ND	ND	---	---		34,4	21,7	17,1	24,4	9,0	

ND: no detectable, DNC: detectable no cuantificable, DS: desviación estándar, Det: detectabilidad.

En cuanto a las diferencias entre especies, no se observaron grandes variaciones en los valores de concentración presentados para un mismo fármaco. Una excepción se observó para la carbamazepina que pareciera presentar una acumulación preferencial en el dorado. Ello podría estar vinculado al nivel trófico que ocupa esta especie, siendo la única ictiófaga entre las estudiadas. Por otro lado, el bagre amarillo (72%) y el sábalo (67%) presentaron la mayor cantidad de fármacos detectables. Luego les siguen el dorado (50%) y finalmente la boga (28%) que resultó la especie más “limpia”. En la [Figura 4.3](#), se muestra un cromatograma representativo de una muestra de bagre amarillo.



Para aquellos fármacos que han sido estudiados previamente por otros autores, como atenolol, cafeína, carbamazepina y enalapril, las concentraciones de carbamazepina encontradas en este trabajo han sido del mismo orden de magnitud que las halladas en peces de España (Huerta et al., 2013) pero un orden mayor que los hallados en USA (Ramírez et al., 2007; Ramirez et al., 2009; Wang and Gardinali, 2012), mientras que este fármaco siempre estuvo por debajo de los límites de detección en peces colectados en Alemania (Subedi et al., 2011; Subedi et al., 2012). Según los trabajos previos, el atenolol y cafeína no fueron detectados e ningún pez de España y USA.

Para metformina, enalapril y sildenafil no existen datos previos en la literatura. En el caso de enalapril no se detectó en ninguna de las muestras. Por otro lado las concentraciones de metformina y sildenafil serían el primer reporte que existe a nivel internacional. Esta situación resalta la importancia de este trabajo que permitió detectar los primeros resultados de concentraciones de estos compuestos en músculos de peces de importancia pesquera y para el consumo en el Río Uruguay.

6. CONCLUSIONES

En relación a la hipótesis planteada en el presente trabajo final, se puede concluir:

- Ninguna de las mezclas de extracción propuestas en la metodología planteadas por [Ramírez et al., \(2007\)](#) reprodujo los resultados presentados por dichos autores y la mezcla de acetato de etilo-acetona aquí propuesta arrojó los mejores resultados.
- La complejidad de la matriz obtenida de los extractos indujo una elevada supresión iónica que plantea, a fin de mejorar los límites de detección del método utilizado, la necesidad de desarrollar un método de clean-up y/o un gradiente cromatográfico con tiempos de elución más extendidos que reduzcan la co-elución de compuestos.
- El método de fortificación resultó muy útil para compensar el efecto matriz y lograr resultados robustos en cuanto a la reproducibilidad y con límites de detección suficientemente bajos para detectar y cuantificar, a excepción del paracetamol, la mayoría de los fármacos estudiados en los músculos de las especies de peces seleccionadas.
- Se reportan por primera vez valores de concentración de atenolol, cafeína, carbamazepina y metformina en muestras de músculos de las especies de peces Parano-Platenses de interés pesquero y de consumo local capturadas en aguas del Bajo Uruguay. Para el caso de la metformina y sildenafil serían los primeros reportes de niveles cuantificables de estos fármacos a nivel internacional.

7. BIBLIOGRAFIA

- Al-Ansari, A.M., Saleem, A., Kimpe, L.E., Sherry, J.P., McMaster, M.E., Trudeau, V.L., Blais, J.M., 2010. Bioaccumulation of the pharmaceutical 17 α -ethinylestradiol in shorthead redhorse suckers (*Moxostoma macrolepidotum*) from the St. Clair River, Canada. *Environ Pollut* 158, 2566-2571.
- Ardrey, R.E., 2003. *Liquid Chromatography-Mass Spectrometry: An Introduction* John Wiley, London.
- Barron, L., Tobin, J., Paull, B., 2008. Multi-residue determination of pharmaceuticals in sludge and sludge enriched soils using pressurized liquid extraction, solid phase extraction and liquid chromatography with tandem mass spectrometry. *Journal of Environmental Monitoring* 10, 353-361.
- Berrada, H., Borrull, F., Font, G., Marcé, R.M., 2008. Determination of macrolide antibiotics in meat and fish using pressurized liquid extraction and liquid chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1208, 83-89.
- Boxall, A.B.A., Rudd, M.A., Brooks, B.W., Caldwell, D.J., Choi, K., Hickmann, S., Innes, E., Ostapyk, K., Staveley, J.P., Verslycke, T., Ankley, G.T., Beazley, K.F., Belanger, S.E., Berninger, J.P., Carriquiriborde, P., Coors, A., DeLeo, P.C., Dyer, S.D., Ericson, J.F., Gagné, F., Giesy, J.P., Gouin, T., Hallstrom, L., Karlsson, M.V., Joakim Larsson, D.G., Lazorchak, J.M., Mastrocco, F., McLaughlin, A., McMaster, M.E., Meyerhoff, R.D., Moore, R., Parrott, J.L., Snape, J.R., Murray-Smith, R., Servos, M.R., Sibley, P.K., Straub, J.O., Szabo, N.D., Topp, E., Tetreault, G.R., Trudeau, V.L., Van Der Kraak, G., 2012. Pharmaceuticals and personal care products in the environment: What are the big questions? *Environ. Health Perspect.* 120, 1221-1229.
- Brooks, B.W., Chambliss, C.K., Stanley, J.K., Ramirez, A., Banks, K.E., Johnson, R.D., Lewis, R.J., 2005. Determination of select antidepressants in fish from an effluent-dominated stream. *Environ. Toxicol. Chem.* 24, 464-469.
- Carabias-Martínez, R., Rodríguez-Gonzalo, E., Revilla-Ruiz, P., Hernández-Méndez, J., 2005. Pressurized liquid extraction in the analysis of food and biological samples. *J. Chromatogr. A* 1089, 1-17.
- Cháfer-Pericás, C., Maquieira, Á., Puchades, R., Company, B., Miralles, J., Moreno, A., 2010. Multiresidue determination of antibiotics in aquaculture fish samples by HPLC-MS/MS. *Aquac. Res.* 41, e217-e225.
- Chu, S., Metcalfe, C.D., 2007a. Analysis of paroxetine, fluoxetine and norfluoxetine in fish tissues using pressurized liquid extraction, mixed mode solid phase extraction cleanup and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1163, 112-118.
- Chu, S., Metcalfe, C.D., 2007b. Simultaneous determination of triclocarban and triclosan in municipal biosolids by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1164, 212-218.
- Corcoran, J., Winter, M.J., Tyler, C.R., 2010. Pharmaceuticals in the aquatic environment: A critical review of the evidence for health effects in fish. *Critical Reviews in Toxicology* 40, 287-304.
- Elorriaga, Y., Marino, D.J., Carriquiriborde, P., Ronco, A.E., 2013a. Human Pharmaceuticals in Wastewaters from Urbanized Areas of Argentina. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 90, 397-400.
- Elorriaga, Y., Marino, D.J., Carriquiriborde, P., Ronco, A.E., 2013b. Screening of pharmaceuticals in surface water bodies of the Pampas region of Argentina. *Int. J. Environment and Health* 6, 330-339.
- Huerta, B., Jakimska, A., Gros, M., Rodríguez-Mozaz, S., Barceló, D., 2013. Analysis of multi-class pharmaceuticals in fish tissues by ultra-high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1288, 63-72.
- Huerta, B., Rodríguez-Mozaz, S., Barceló, D., 2012. Pharmaceuticals in biota in the aquatic environment: Analytical methods and environmental implications. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 404, 2611-2624.
- ICH, 2005. Q2(R1): Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology, ICH Harmonised Tripartite Guideline. International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human, Geneva.
- Ramirez, A.J., Brain, R.A., Usenko, S., Mottaleb, M.A., O'Donnell, J.G., Stahl, L.L., Wathen, J.B., Snyder, B.D., Pitt, J.L., Perez-Hurtado, P., Dobbins, L.L., Brooks, B.W., Chambliss, C.K., 2009. Occurrence of pharmaceuticals and personal care products in fish: Results of a national pilot study in the United States. *Environ. Toxicol. Chem.* 28, 2587-2597.
- Ramírez, A.J., Mottaleb, M.A., Brooks, B.W., Chambliss, C.K., 2007. Analysis of pharmaceuticals in fish using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal. Chem.* 79, 3155-3163.

- Schlüsener, M.P., Bester, K., 2005. Determination of steroid hormones, hormone conjugates and macrolide antibiotics in influents and effluents of sewage treatment plants utilising high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry with electrospray and atmospheric pressure chemical ionisation. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 19, 3269-3278.
- Schultz, M.M., Furlong, E.T., Kolpin, D.W., Werner, S.L., Schoenfuss, H.L., Barber, L.B., Blazer, V.S., Norris, D.O., Vajda, A.M., 2010. Antidepressant pharmaceuticals in two U.S. effluent-impacted streams: Occurrence and fate in water and sediment and selective uptake in fish neural tissue. *Environ. Sci. Technol.* 44, 1918-1925.
- Subedi, B., Du, B., Chambliss, C.K., Koschorreck, J., Rüdell, H., Quack, M., Brooks, B.W., Usenko, S., 2012. Occurrence of pharmaceuticals and personal care products in German fish tissue: A national study. *Environ. Sci. Technol.* 46, 9047-9054.
- Subedi, B., Mottaleb, M.A., Chambliss, C.K., Usenko, S., 2011. Simultaneous analysis of select pharmaceuticals and personal care products in fish tissue using pressurized liquid extraction combined with silica gel cleanup. *J. Chromatogr. A* 1218, 6278-6284.
- USEPA, 2000. Guidance for Assessing Chemical Contaminant Data for Use in Fish Advisories. Volume 2, Third edition. Risk Assessment and Fish Consumption Limits. Office of Water. EPA 823-B-99-008, Washington, DC.
- Wang, J., Gardinali, P.R., 2012. Analysis of selected pharmaceuticals in fish and the fresh water bodies directly affected by reclaimed water using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 404, 2711-2720.
- Zenker, A., Cicero, M.R., Prestinaci, F., Bottoni, P., Carere, M., 2014. Bioaccumulation and biomagnification potential of pharmaceuticals with a focus to the aquatic environment. *Journal of Environmental Management* 133, 378-387.

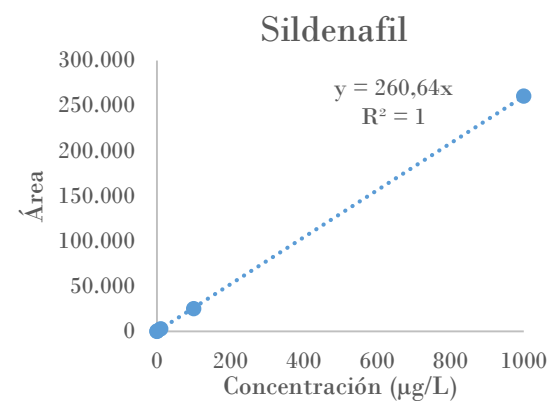
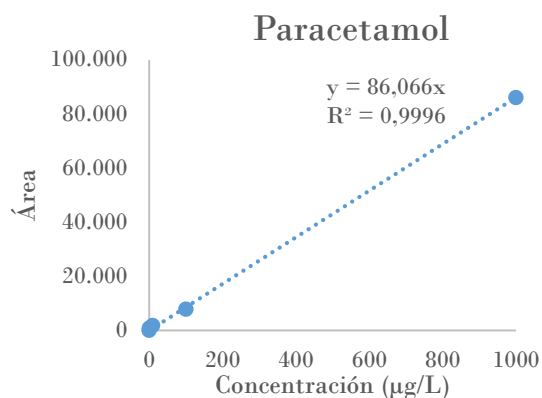
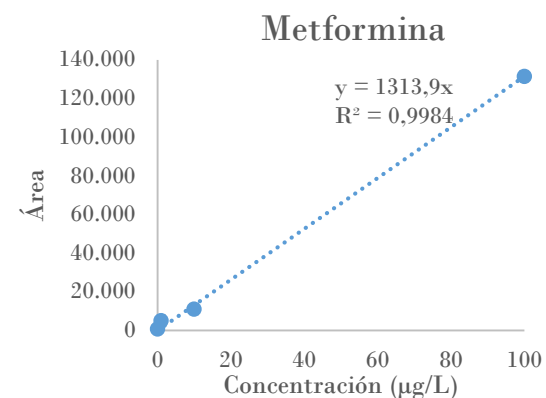
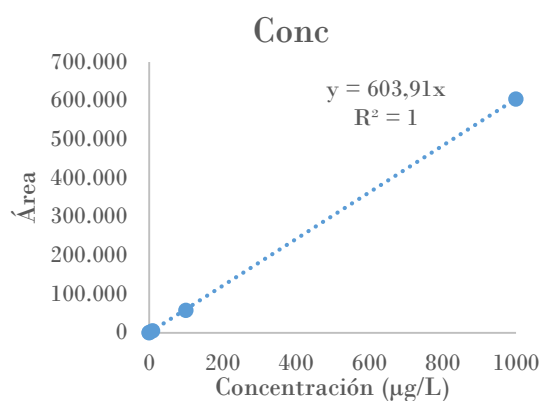
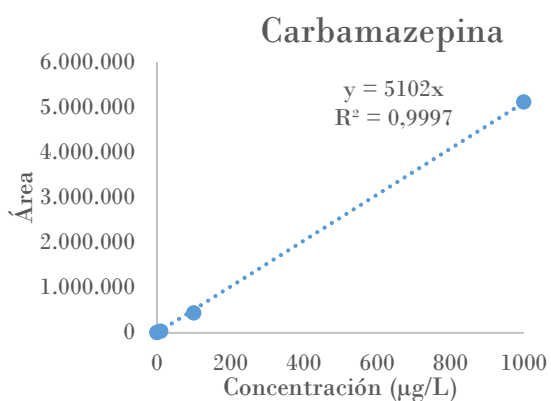
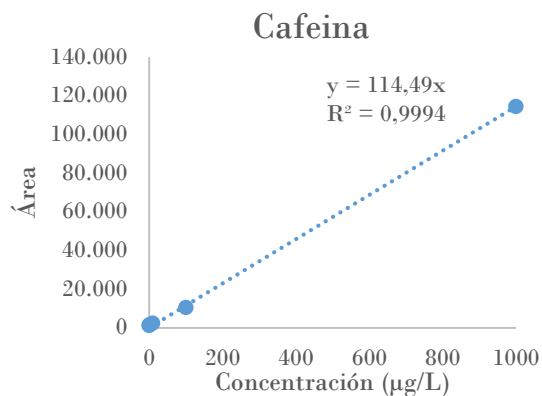
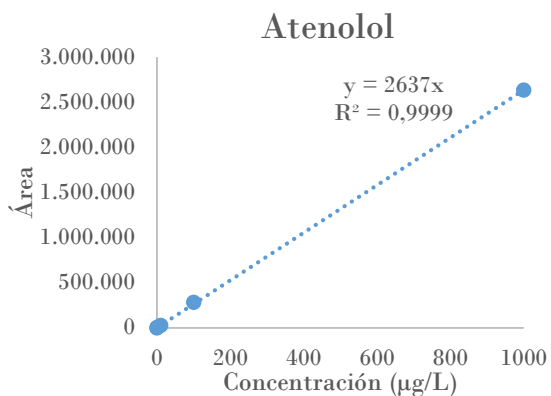
8. ANEXOS

8.1. Anexo I. Valores de áreas cromatográficas obtenidas para los estándares

Tabla 4.3. (anexo): Área promedio de los patrones en tres días diferentes

	Atenolol	Cafeína	Carbamazepina	Enalapril	Metformina	Paracetamol	Sildenafil
Blanco							
1	226	1.508	3.990	0	836	578	0
2	126	1.066	4.975	0	736	0	0
3	326	1.287	6.995	0	936	0	0
Standard_1ppb							
1	6.767	1.575	5.100	315	6.188	837	340
2	5.767	1.675	3.942	515	4.867	937	415
3	7.767	1.475	4.170	422	4.200	1.037	340
Standard_10ppb							
1	17.469	2.553	28.296	2.847	7.223	2.553	1.146
2	40.965	2.268	33.181	5.779	14.880	1.283	4.779
3	29.217	2.411	30.739	4.313	11.052	1.918	2.963
Standard_100ppb							
1	198.793	8.772	533.000	35.328	111.298	6.220	22.193
2	385.943	11.537	433.026	68.116	151.820	8.811	28.116
3	268.935	10.615	433.018	57.187	131.559	7.947	24.911
Standard_1000ppb							
1	2.888.560	85.000	4.268.584	403.693	921.035	73.799	226.704
2	3.430.396	129.344	5.530.584	704.525	821.235	92.282	304.525
3	1.585.821	114.563	5.109.917	604.248	721.435	86.121	250.995

8.2.Anexo II. Curvas de calibración de los compuestos farmacéuticos estudiados en metanol.



8.3.Anexo III. Valores de áreas análisis de recuperación.

Tabla 4.4. (Anexo) Áreas muestras músculo fortificadas para estimación de recuperación

		Atenolol	Cafeína	Carbamazepina	Enalapril	Metformina	Paracetamol	Sildenafil
Acido Acético/MeOH	BL	1	12.233	9.946	1.521.709	123.191	0	2.916
		2	14.988	10.463	1.479.732	127.239	0	3.104
		3	15.400	10.983	1.502.916	132.217	0	2.851
	100	1	19.240	13.699	1.433.381	158.005	0	6.645
		2	16.982	12.595	1.777.939	172.443	0	2.078
		3	20.687	13.555	1.663.475	183.189	0	3.375
	1000	1	31.255	12.299	1.224.403	107.171	0	0
		2	18.638	9.857	1.465.176	137.225	0	0
		3	24.378	12.226	1.715.640	163.937	0	0
Acn/MeOH	BL	1	0	0	54.750	447	0	0
		2	0	0	35.624	628	0	0
		3	879	0	16.248	215	0	0
	100	1	4.586	6.131	852.727	186.937	0	0
		2	4.055	4.890	690.085	164.724	0	0
		3	9.951	6.973	997.845	93.073	0	0
	1000	1	19.032	21.801	3.539.878	305.217	103.218	3.711
		2	18.160	20.846	2.071.408	205.953	62.640	1.945
		3	27.002	27.052	4.649.607	389.350	66.419	4.501
Acetona/MeOH	BL	1	0	1.836	19.960	250	0	2.757
		2	0	2.388	18.262	408	0	4.957
		3	0	937	25.938	322	0	5.082
	100	1	0	6.851	250.504	14.770	0	301.285
		2	0	2.694	459.544	60.036	0	82.728
		3	0	4.185	673.816	13.780	0	240.660
	1000	1	16.615	16.540	2.366.211	345.696	0	4.300
		2	12.583	25.598	3.436.044	464.476	0	8.163
		3	19.159	21.069	2.901.128	405.086	0	6.103
Etilacetato/MeOH	BL	1	0	0	16.775	354	0	0
		2	0	0	18.945	444	0	0
		3	0	0	13.596	746	0	0
	100	1	24.050	34.379	3.635.676	517.136	0	0
		2	18.477	23.256	2.326.999	363.738	0	0
		3	12.903	12.133	1.018.322	210.340	0	0
	1000	1	11.155	16.703	1.135.083	206.420	0	2.988
		2	9.596	23.585	2.567.572	329.238	0	5.295
		3	10.376	20.144	1.851.328	267.829	0	4.142
Etilacetato/acetona	BL	1	210	0	1.725	0	0	0
		2	304	0	9.314	444	0	0
		3	152	0	6.552	0	0	0
	100	1	7.335	6.364	402.504	52.788	0	0
		2	2.443	4.919	264.975	54.970	0	0
		3	4.785	5.987	259.189	55.552	0	0
	1000	1	55.474	47.363	4.277.716	588.644	43.218	8.286
		2	58.906	43.960	2.901.030	461.946	62.640	7.762
		3	38.213	39.119	5.225.547	607.238	64.419	8.138

8.4. Anexo IV. Valores de áreas cromatográficas obtenidas para los análisis de efecto matriz

Tabla 4.5 (Anexo) Áreas corridas efecto matriz

	Acetonitrilo-Metanol			Acetato de etilo-Acetona		
	1	2	3	1	2	3
Atenolol						
0 ppb	145	172	133	0	0	0
1 ppb	100	150	172	0	0	0
10 ppb	362	400	300	445	600	748
100 ppb	2.119	1.184	1.700	4.346	5.700	4.173
Cafeína						
0 ppb	15	20	10	30	50	40
1 ppb	19	21	25	248	321	252
10 ppb	311	515	410	660	610	705
100 ppb	1.504	2.665	2.100	4.288	4.402	4.173
Carbamazepina						
0 ppb	14.661	16.417	12.904	1.172	991	1.352
1 ppb	12.961	12.627	18.587	1.800	1.500	1.200
10 ppb	20.682	29.971	18.748	16.163	13.926	9.306
100 ppb	71.054	44.529	60.000	90.514	94.526	132.912
Enalapril						
0 ppb	0	0	0	28	30	25
1 ppb	0	0	0	50	43	61
10 ppb	75	115	122	3.010	4.445	2.886
100 ppb	31.048	25.454	28.251	45.429	59.993	34.758
Metformina						
0 ppb	100	200	300	0	0	0
1 ppb	530	303	660	185	170	201
10 ppb	849	1.000	900	750	878	645
100 ppb	3.498	4.498	3.998	5.227	8.245	6.897
Paracetamol						
0 ppb	0	0	99	0	0	302
1 ppb	0	20	51	46	9	123
10 ppb	0	0	48	0	49	0
100 ppb	55	0	0	0	53	0
Sildenafil						
0 ppb	13	17	22	0	0	0
1 ppb	50	50	60	50	60	40
10 ppb	90	63	80	73	105	76
100 ppb	377	274		728	952	654

8.5. Anexo V. Curvas realizadas por fortificación de los extractos

